- POLYMORPHISM (GENETIC)
MEDICAL GENETICS
ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

TESIS

POLA ALEL LOKUS HUMTH01 PADA POPULASI BATAK DI SURABAYA

TKG 02/06
1 Nov

MASNIARI NOVITA
090314999M

PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

TESIS

POLA ALEL LOKUS HUMTH01 PADA POPULASI BATAK DI SURABAYA

MASNIARI NOVITA
090314999M

PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005

POLA ALEL LOKUS HUMTH01 PADA POPULASI BATAK DI SURABAYA

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

oleh :
Masniari Novita
090314999M

PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
Tanggal 9 September 2005

Lembar pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 23 AGUSTUS 2005

Oleh

Pembimbing Ketua

DR. Mieke Sylvia MAR, drg, MS, SpOrt
NIP. 130 675 829

Pembimbing,

Prof. DR. Med. dr. HM Soekry EK, SpF, DFM
NIP. 130 359 282

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi
Program Pascasarjana Universitas Airlangga

DR. Trijoedani Widodo, drg, MS, SpKG
NIP. 130 368 691

Telah diuji pada
Tanggal 9 September 2005

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : dr. Ni Wayan Tirthaningsih, MS

Anggota : 1. DR. Mieke Sylvia Margaretha Amiatun Ruth, drg, MS, SpOrt

2. Prof. DR. Med. dr. HM Soekry Erfan Kusuma, SpF, DFM

3. DR. R. Darmawan Setijanto, drg, MS

4. drg. Susy Kristiani, MS

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur saya panjatkan kepada Allah yang Maha Pengasih atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya saya ucapkan kepada DR. Mieke Sylvia MAR,drg,MS,SpOrt selaku Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran-saran yang membangun sejak saya mengajukan proposal penelitian sampai selesainya tesis ini.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof.DR.Med.dr.HM Soekry Erfan Kusuma,SpF,DFM selaku Pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran sejak saya mengajukan proposal penelitian sampai selesainya tesis ini.

Saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Pemerintah Indonesia cq. Menteri Pendidikan Nasional melalui Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah memberikan bantuan finansial sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

- Rektor Universitas Airlangga Prof.DR.Med.Puruhito,dr,SpBTKV atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister
- Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof.Dr.H Muhammad Amin,dr atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

- Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember drg.Zahreni Hamzah,MS atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister
- Pimpinan Tropical Diseases Centre Universitas Airlangga Prof.Dr.Yoes Prijatna Dachlan,dr,MSc atas perkenannya sehingga saya dapat menggunakan fasilitas untuk melaksanakan penelitian di TDC
- DR.Trijoedani Widodo,drg,Ms,SpKG selaku Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi yang dengan kesabaran membimbing kami selama mengikuti pendidikan Program Magister
- dr.Ni Wayan Tirthaningsih,MS selaku konsultan bidang Genetika Kedokteran yang dengan perhatian telah memberikan masukan dan arahan dalam tesis ini
- DR. R. Darmawan Setijanto, drg, MS yang telah membimbing dalam Metodologi Penelitian dan Statistik sehingga tesis ini dapat terselesaikan
- Bapak Mohd. Choesen Masjkur dan Ibu Indah Nuraini Masjkur,S.Si yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian dalam tesis ini
- Kelompok marga Parna dan Pomparan Raja Sinaga Surabaya yang telah membantu dalam pendataan populasi Batak di Surabaya
- Kepada teman-teman angkatan 2003 Program Ikesgi drg.Nanik Zubaidah,Sp.KG, drg. Agung Krismariono, Sp.Perio dan drg. Enny Wiliyanti, sahabatku drg.Ketut Suardita, Ph.D yang telah mendukung saya baik dalam suka dan duka selama mengikuti pendidikan ini, serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang terlibat baik langsung maupun tidak langsung dalam penyelesaian tesis ini
- Suamiku Josef S. Hamid dan kedua anakku Naomi dan Jason yang dengan tulus dan penuh cinta telah memberikan kesempatan, waktu, dorongan dan doa dalam saya menjalani pendidikan program Magister ini

Kami menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam tesis ini dan kami menerima saran dan kritikan untuk perbaikan. Akhir kata semoga tesis ini mampu memberikan manfaat bagi kita semua.

Penulis

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

RINGKASAN
POLA ALEL LOKUS HUMTH01
PADA POPULASI BATAK DI SURABAYA

Masniari Novita

Pendahuluan

Teknik identifikasi genetik merupakan salah satu bukti fisik yang digunakan dalam bidang forensik. Teknik identifikasi genetik merupakan alat diagnostik yang akurat dalam bidang forensik dan sangat layak digunakan untuk mengidentifikasi korban masal. Ada enam bahan pengidentifikasi yang digunakan dalam bidang forensik yaitu : sidik jari, gigi, medis, barang bawaan, fotografi dan biologi molekuler (DNA).

DNA yang digunakan sebagai bahan pemeriksaan sidik jari DNA itu sendiri adalah sebuah polimer organik yang ditemukan dalam sel setiap organisme. Polimer ini tersusun atas 3 bagian yang spesifik yaitu : *phosphate groups,* gula deoxyribose dan basa nitrogen.

Lokus HUMTH01 merupakan lokus STR yang polimorfismenya sangat tinggi yang terdapat pada kromosom 11 p15.5-p15. *Short Tandem Repeat (STR)* merupakan daerah DNA dengan *repeat motive* antara 3 sampai 7 bp. Data polimorfisme DNA di Surbaya sebagaimana di Indonesia sampai saat ini belum ada, padahal data ini sangat penting dalam bidang forensik.

Populasi Batak mempunyai sistem kekerabatan patrilineal yang menjadi tulang punggung masyarakat Batak yang terdiri dari turunan-turunan, marga dan kelompok-kelompok suku. *Gene pool* populasi ini lebih asli karena sulitnya pria Batak untuk menikah dengan wanita dari populasi lain. Populasi ini juga sudah menyebar luas ke berbagai daerah di Nusantara.

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut : bagaimanakah pola alel lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya?

Tinjauan pustaka

Satu molekul DNA terdiri dari 2 rantai nukleotida yang membentuk ikatan *double helix*. Untaian DNA berikatan nonkovalen melalui ikatan hydrogen antara basa dari untaian lawannya yang membentuk *base pair*.

DNA dapat diisolasi dari spesimen yang potensial termasuk darah, sperma, sel akar rambut, tulang, kulit, usus dan hapusan rongga mulut atau vagina.

PCR adalah suatu metode dimana sekuen DNA target ditambahkan dengan DNA polymerase yang tepat. Termasuk didalamnya adalah memakai primer yang tepat untuk mengaktivasi polimerase agar dapat mengamplifikasi sekuen DNA sehingga akan melepas DNA dengan pita ganda menjadi DNA pita tunggal dengan menggunakan pemanasan.

Agarose merupakan derivat polisakarida dari ganggang laut yang membentuk gel solid dalam larutan air pada konsentrasi antara 0,5% sampai 2% (w/v). Agarose yang digunakan untuk *electrophoresis* lebih murni daripada agar yang digunakan untuk kultur bakteri. Sampel DNA diletakkan dalam sumuran pada permukaan gel dan akan bergerak sepanjang lintasan dalam gel.

Variasi urutan basa DNA di dalam setiap sel manusia dikenal dengan sifat polimorfisme dan ini dimanfaatkan oleh dunia forensik untuk dijadikan sebagai dasar uji DNA termasuk yang berkaitan dengan *parentage disputed* yang pertama kalinya dimulai tahun 1985 dengan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*.

30% DNA adalah *repetitive* dan tidak mempunyai fungsi mensintesa protein. *Repetitive* DNA dibagi menjadi *satellite* DNA yang salah satunya adalah

microsatellite(STR). Lokus STR memiliki ukuran alel yang kecil dan dapat dipisahkan dengan *polyacrilamide gel electrophoresis*. STR DNA *profiling* dapat dikerjakan dalam beberapa hari, lebih pendek daripada RFLP yang memerlukan waktu beberapa minggu.

Lokus HUMTH01 berukuran antara 179 – 203 bp dengan variasi alel antara 5 sampai 11. Metode *typing* HUMTH01 merupakan metode yang masuk akal, kuat dan efisien sehingga merupakan metode yang bermanfaat pada kasus-kasus forensik.

Materi dan metode penelitian

Jenis penelitian ini adalah observasional laboratoris dengan rancangan *cross sectional*. Digunakan rumus besar sampel dari Daniel untuk populasi yang finit. Teknik pengambilan sampel adalah *simple random sampling*.

Bahan penelitian dari hapusan mukosa bukal populasi Batak yang tinggal di Surabaya yang memenuhi kriteria sampel yaitu : tidak ada kawin campur 2 generasi di atasnya dan telah menetap di Surabaya minimal 20 tahun. Digunakan PCR primer HUMTH01 dari Promega dengan susunan :

5′-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3′

5′-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG-3′

Isolasi DNA menggunakan metode Trizol, kemudian PCR protocol dijalankan dengan program untuk TH01. Setelah itu dilakukan *electrophoresis* dengan bahan *polyacrilamide agarose composite gel* dan pewarnaan *silver staining*. Kemudian dibaca alel yang muncul dengan panduan *marker* 100, *marker* K562 dan alel *marker* dari CTT multiplex.

Analisis hasil penelitian

Dari hasil PCR 50 sampel ternyata hanya 42 sampel yang didapat *PCR product* nya. Dari 42 sampel tersebut hanya alel 7, 8, 9, 10 dan 11 yang mucul dari 7 alel lokus HUMTH01. Frekuensi alel 10 yang terbesar 38,1%, kemudian alel 9

(34,52%) dan alel 11 (19,05%). Alel 7 hanya 3,57% dan alel 8 hanya 4,76%. 52,38% pasangan alel adalah *homozygote*. Pasangan alel 9, 9 (23,81%) yang paling sering muncul, kemudian pasangan alel 10, 11 (21,43%) dan pasangan alel 10, 10 (19,05%) sedangkan yang lainnya dibawah 14,29%.

Pembahasan

Sampel forensik sering sudah terdegradasi dan jumlahnya sangat sedikit sehingga sulit untuk dianalisa secara konvensional dengan analisa RFLP. Lokus STR mempunyai ukuran alel yang kecil sehingga dapat diamplifikasi dengan mudah melalui PCR dan sampel yang terdegradasi dapat dipertanggung jawabkan hasil analisanya.

Lokus HUMTH01 dipilih dalam penelitian ini karena valid dalam studi populasi dan merupakan salah satu dari 13 lokus STR yang didisain FBI yang bersinergi dengan CODIS *database,* juga merupakan standar lokus yang digunakan menurut EDNAP dan rekomendasi ENFSI.

Metode pengambilan sampel dengan hapusan mukosa bukal ternyata sangat efektif dan akurat untuk melihat lokus STR. Metode ini selain tidak menimbulkan rasa sakit, aplikasi dalam mulut mudah, juga bisa mendapatkan DNA yang cukup untuk dilakukan PCR.

Berdasarkan hasil penelitian ini ternyata populasi Batak yang tinggal di Surabaya mempunyai ukuran alel antara 195 – 199 bp dengan alel yang paling sering muncul adalah alel 10. Hal ini agak berbeda dengan penelitian serupa di luar negeri di mana alel yang paling sering muncul adalah alel 9. Kemungkinan perbedaan ini disebabkan jumlah sampel yang hanya 42.

Sebagian besar populasi ini adalah *homozygote* (52,38%). Pasangan alel 9, 9 (23,81%) yang paling sering muncul, kemudian pasangan alel 10, 11 (21,43%) dan pasangan alel 10, 10 (19,05%) sedangkan yang lainnya dibawah 14,29%.

Penggunaan *polyacrilamide agarose composite gel* dalam penelitian ini ternyata banyak keuntungannya. Penambahan *composite* ternyata membuat bahan ini kuat, dapat dikeringkan dan awet sehingga dapat digunakan sebagai barang bukti otentik dalam persidangan.

Kesimpulan dan saran

Dari hasil penelitian lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya ternyata hanya 5 dari 7 alel lokus ini yang muncul yaitu alel 7, 8, 9, 10 dan 11. Alel yang paling sering muncul adalah alel 10 dan pasangan alel terbanyak adalah *homozygote* yaitu pada alel 9, 9.

Disarankan untuk dilakukan penelitian dengan jumlah sampel yang lebih besar untuk melihat munculnya alel 5 dan 6, juga dilakukan penelitian pada populasi lain di Indonesia.

SUMMARY

ALLELIC PATTERN OF HUMTH01 LOCUS IN THE BATAK POPULATION IN SURABAYA

Masniari Novita

Introduction

Genetic identification technique, one of the physical evidence used in forensic medicine, provide a powerful diagnostic tool and can successfully be applied to the identification of disaster victims. There are six identifiers used in the forensic such as fingerprints, dental, medical, property, photography and molecular biology (DNA).

DNA used in the DNA fingerprinting is an organic polymerfound in every organism cells. This polymer contains of 3 spesific material such as phosphate groups, deoxyribose sugar and nitrogen bases.

HUMTH01 locus is a STR locus with high polymorphism located in the chromosome 11 p.15.5 – p.15. The Short Tandem Repeat (STR) is a DNA region with repeat motive between 3 until 7 bp. The DNA polymorphisms data in Surabaya as well as in Indonesia are not available, but it is very important in forensic medicine.

Batak population has patrilineal relationships which become the backbone of this society which comprises the heritances, marga and population groups. This population gene pool is more native because the man of this society hardly married to other populations. Some of these people have already migrated to another area around Indonesia.

According to this background, we decided a problem : how is the allelic pattern of HUMTH01 locus in the Batak population in Surabaya.

Review

The DNA molecule comprises of 2 nucleotides chain that performed a double helix bond. The strands are joined noncovalently by hydrogen bonding between the bases on opposite strands, to form base pairs.

DNA can be isolated from potential specimens including blood, sperm, hair root cells, bone, skin, intestine, and oral plus vaginal swab.

PCR is a method by wich the target DNA sequence is augmented with appropriate DNA polymerase. It involves selecting an appropriate primer in order to activate the polymerase sufficiently to amplify the DNA sequence, thus reducing the double DNA strand to the single-strand DNA by heating.

Agarose is a polysaccharide derived from seaweed, which forms a solid gel when dissolved in aquaeous solution at concentration between 0,5 and 2% (w/v). Agarose used for electrophoresis is a more purified form of the agar used to make bacterial culture plates. The DNA samples are placed in wells in the gel surface, and the DNA is allowed to migrate through the gel in separate lanes.

The DNA bases variation in every human cell known with polymorphisms characterictic and used by the forensics as a DNA basic study including cases of parentage disputed that first begin at 1985 with Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) method.

30% of DNA is repetitive and do not have function to synthesize protein. Repetitive DNA divided to satellite DNA which one of this is microsatellite (STR). The STR locus has little allele size and could be separated with polyacrilamide gel electrophoresis. STR DNA profiling could be done in several days while the RFLP needed several weeks to be done.

HUMTH01 locus is a DNA between 179 until 203 bp with allelic variation between 5 until 11. HUMTH01 typing method is a reliable, robust and efficient method thus become a useful method in forensic cases.

Material and methode

This was an observasional laboratories study with cross sectional method, using the sample size formula by Daniel for finite population and technique getting sample by simple random sampling method.

The material of this study was the mucosa buccal swab from Batak population in Surabaya that met the sample criteria : no mix married up to second generation and had been living in Surabaya for 20 years. We used the HUMTH01 PCR Primer by Promega :

5′-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3′

5′-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG-3′

We used the Trizol method to isolate the DNA and subsequently the PCR protocol for HUMTH01 locus. After that the samples were subjected to polyacrilamide agarose composite gel and silver staining. The allele was read by the marker 100 bp, marker K562 and the allele marker of CTT multiplex as a guide.

Result

From 50 samples subjected to PCR we only got the PCR product from 42 samples. From the 42 samples only allele 7, 8, 9, 10 and 11 were found from 7 allele of HUMTH01 locus. The highest frequency is allele 10 (38,1%) then allele 9 (34,52%) and allele 11 (19,05%). Allele 7 only 3,57% and allele 8 only 4,76%. Most of this population was homozygote (52,38%). The most frequent couple allele is 9, 9 (23,81%) then 10, 11 (21,43%) and 10, 10 (19,05%) while the others were less than 14,29%.

Discussion

Since forensic samples are often degraded limited in quantity, they may not always be suitable for analysis by conventional RFLP analysis. Since the STR loci have small allele sizes they can be amplified easily by PCR and the degraded samples are more amenable to analysis.

We choose the HUMTH01 locus because it validity in population study and it is one of the 13 STR loci designed by FBI in synergy with the CODIS database, and because it is one of the 4 standard loci suggested by EDNAP and recommended by ENFSI.

The buccal mucosa swab provides accurate and effective results in the STR loci. This method is painless, applicable, and result in good quantity of DNA for PCR.

In this study we found that Batak populations in Surabaya have allele size of 195 – 199 bp, which allele 10 is the most frequent. It is different with the similar study in foreign that the mos frequent allele is 9. This difference maybe because in this study only use 42 samples.

Most of this populations are homozygote (52,38%). The most frequent couple allele is 9, 9 (23,81%) then 10, 11 (21,43%) and 10, 10 (19,05%) while the others were less than 14,29%.

Polyacrilamide agarose composite gel used in this study having lots of benefits. The added of composite make this gel stronger, easy to dry and long lasting thus can be used in court as an authentic evidence.

Conclusion

In this study of HUMTH01 locus in the Batak population in Surabaya only 5 alleles from 7 alleles of this locus that found which are allele 7, 8, 9, 10 and 11. The most frequent allele is allele 10 and the most frequent couple allele is 9, 9.

We suggested to study with more samples to found allele 5 and 6, and do study in other populations around Indonesia.

ABSTRACT

ALLELIC PATTERN OF HUMTH01 LOCUS IN THE BATAK POPULATION IN SURABAYA

Frequency distribution of every alleles of polymorphism was needed in forensic identification. However, data on that distribution in Surabaya as well as in Indonesia are not available. We studied 42 individuals from Batak population in Surabaya. Locus HUMTH01 of Short Tandem Repeat (STR) was chosen in this study, and the DNA samples were extracted from buccal mucosa cells. The samples were subjected to PCR and subsequently to polyacrilamide agarose composite gel electrophoresis and silver staining. From 7 alleles of HUMTH01 taken from 42 individuals from Batak population in Surabaya, only alleles number 7, 8, 9, 10 and 11 were found. The frequency of allele 7 was 3,57%, allele 8 was 4,76%, allele 9 was 34,52%, allele 10 was 38,1% and allele 11 was 19,05%. The frequency of homozygote was 52,38%. The phenotype 9, 9 was the most common type (23,81%) and then the phenotype 10, 11 (21,43%). A comparison of this study results also made to other population studies in Thailand, Taiwan, Philippines and Portugese.

Key words : HUMTH01 locus, Batak population, allele frequency

DAFTAR ISI

Halaman

Sampul Depan i

Sampul Dalam ii

Prasyarat Gelar iii

Persetujuan iv

Penetapan Panitia v

Ucapan terima kasih vi

Ringkasan ix

Summary xiv

Abstrak xix

DAFTAR ISI xx

DAFTAR TABEL xxii

DAFTAR GAMBAR xxiii

DAFTAR LAMPIRAN xiv

BAB 1 PENDAHULUAN 1

1.1. Latar Belakang 1

1.2. Rumusan Masalah 4

1.3. Tujuan Penelitian 5

1.4. Manfaat Penelitian 5

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA 6

2.1. DNA Sebagai Metode Identifikasi Forensik 6

2.2. Polimorfisme DNA 8

2.3. *Short Tandem Repeat* 10

2.4. Lokus HUMTH01 12

2.5. Populasi Batak 13

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL 16

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN 18

4.1. Jenis Penelitian 18

4.2. Rancangan Penelitian 18

4.3. Populasi, Besar Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel 18

4.4. Variabel Penelitian 18

4.5. Bahan Penelitian 18

4.6. Instrumen Penelitian 19

4.7. Lokasi dan Waktu Penelitian 19

4.8. Prosedur Pengambilan Data 19

4.9. Cara Pengolahan dan Analisis Data 21

BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN 23

5.1. Data Penelitian 23

5.2. Analisis dan Hasil Penelitian 25

BAB 6 PEMBAHASAN 28

BAB 7 PENUTUP 35

7.1. Kesimpulan 35

7.2. Saran 35

DAFTAR PUSTAKA 36

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Frekuensi alele lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya 25

Tabel 2. Perbandingan pasangan alele *heterozygote* dan *homo-zygote* dari lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya 26

Tabel 3. Perbandingan pasangan-pasangan alele lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya 27

Tabel 4. Perbandingan variasi alele yang muncul, alele yang tidak muncul dan alele yang paling sering muncul pada popu – lasi Thailand di Thailand, populasi Thailand di Taiwan, populasi Taiwan, populasi Philippine di Taiwan, populasi Portugis dan populasi Batak yang tinggal di Surabaya.... 33

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 1. Gambaran alele lokus HUMTH01 setelah dilakukan PCR. Baris ke-6 adalah *marker ladder* 100 bp dan garis paling kanan adalah kontrol alele K562..... 23

Gambar 2. Marker alele HUMTH01 dari marker CTT multiplex yang menggambarkan letak alele antara 5 sampai 11 dengan perbedaan antar alele sebesar 4bp..... 24

Gambar 3. Gambaran alele lokus HUMTH01 setelah dilakukan PCR. Pada garis ke-5 adalah *marker ladder* 100 bp sedangkan pada garis ke-7 adalah kontrol kontrol dan garis ke-8 adalah kontrol positif dari marker K562 ... 24

Gambar 4. Hasil PCR lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya. Dari 7 alele hanya 5 alele yang muncul yaitu alele 7,8,9,10 dan 11..... 25

Gambar 5. Frekuensi *homozygote* dan *heterozygote* lokus HUMTH01 populasi Batak yang tinggal di Surabaya 26

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Keterangan kelaikan etik 38

Lampiran 2. Kuesioner 39

Lampiran 3. Pernyataan persetujuan 40

Lampiran 4. Gambar hasil ELP sampel 1 - 23 41

Lampiran 5. Gambar hasil ELP sampel 24 – 45 42

Lampiran 6. Sampel, PCR primer dan PCR mix, siklus PCR untuk lokus HUMTH01..... 43

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. LATAR BELAKANG

Identifikasi dalam bidang forensik adalah membandingkan data *antermortem* (AM) dan data *postmortem* (PM). Teknik identifikasi genetik merupakan salah satu bukti fisik yang digunakan dalam bidang forensik. Teknik identifikasi genetik merupakan alat diagnostik yang akurat dalam bidang forensik dan sangat layak digunakan untuk mengidentifikasi korban masal. Data genetik individual adalah sama untuk keseluruhan selnya dan akan tetap tidak berubah sekalipun sudah meninggal. Teknik identifikasi genetik saat ini digunakan bersama dengan metode lain yang umum digunakan dalam identifikasi korban masal, khususnya jika tubuh korban sudah mengalami mutilasi. Hasil analisis sampel biologis ini dapat berupa : hubungan genetik dari korban dengan anggota keluarganya, korban ternyata tidak mempunyai hubungan keluarga, dan mencocokkan bagian-bagian tubuh (DVI Giude, 2002).

Ada enam bahan pengidentifikasi dalam bidang forensik yaitu : sidik jari, gigi, medis, barang bawaan, fotografi dan biologi molekuler (DNA). Metode sidik jari, gigi dan analisis DNA termasuk dalam bahan pengidentifikasi utama, sedangkan medis, barang dan fotografi termasuk bahan pengidentifikasi sekunder. Perbandingan DNA bukan digunakan sebagai metode identifikasi primer. Perbandingan DNA digunakan jika metode identifikasi DVI (*Disaster Victim Identification)* gagal atau kurang akurat untuk mengidentifikasi jenasah (DVI Guide, 2002).

Polimorfisme DNA adalah suatu istilah yang digunakan untuk menunjukkan adanya suatu bentuk yang berbeda dari satu struktur dasar yang sama (Atmaja,1992 ; Kusuma, 2004), atau menurut *medical dictionary* polimorfisme DNA adalah suatu

MILIK PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA

keadaan dimana satu atau dua perbedaan yang normal dari sekuen nukleotida dapat muncul pada bagian DNA yang khusus. Jika suatu modifikasi terjadi pada suatu lokus spesifik dalam suatu populasi, maka lokus tersebut dikatakan polimorfik. Suatu lokus baru dapat dikatakan sebagai polimorfik, jika alel yang paling sering ditemukan frekuensinya kurang dari 99% pada lokus yang bersangkutan, dimana menurut hukum Hardy Weinberg sekurangnya 2% dari populasi harus heterozigot pada lokus tersebut (Budowle et al,1991; Kusuma, 2004).

DNA yang digunakan sebagai bahan pemeriksaan sidik jari DNA itu sendiri adalah sebuah polimer organik yang ditemukan dalam sel setiap organisme. Polimer ini tersusun atas 3 bagian yang spesifik yakni: *phosphate groups,* gula *deoxyribose,* dan basa nitrogen. Dua komponen pertama berfungsi sebagai *backbone* yang relatif tetap pada semua individu, sedangkan yang membedakan antara individu satu dengan yang lainnya adalah urutan dari komponen ketiga atau basa nitrogen yang membentuk DNA tersebut, dimana urutan atau susunan basa tersebut berbeda antara satu orang dengan orang yang lainnya kecuali pada kembar *monozygote* (Notosoehardjo, 2001 ; Kusuma,2004).

Lokus HUMTH01 merupakan lokus STR yang polimorfismenya sangat tinggi yang terdapat pada kromosom 11 p15.5-p15 (van Oorschot, 1996). STR atau *Short Tandem Repeat* disebut juga *'microsatellite'* merupakan daerah DNA dengan *core sequences* atau *repeat motive* antara 3 sampai 7 bp (Stimson, 1997 ; Kusuma, 2004).

Penelitian tentang lokus HUMTH01 pada beberapa negara menunjukkan adanya perbedaan alel yang muncul. Alel adalah satu dari serangkaian dua gen yang berbeda atau lebih yang dapat menempati lokus yang sama dari satu kromosom yang spesifik. Penelitian pada populasi Thailand yang tinggal di Thailand menurut Sueblinvong dkk, 1999 muncul 6 alel dimana yang paling sering adalah alel 9 sedangkan alel 5 dan 11 tidak muncul. Pu dkk, 1999 meneliti populasi Thailand

yang tinggal di Taiwan muncul 7 alel dimana yang tersering adalah alel 9 sedangkan alel 11 tidak muncul. Penelitian Pu dkk, 1999 pada populasi Taiwan muncul 8 alel dan yang tersering adalah alel 9 sedangkan pada populasi Philippine yang tinggal di Taiwan alel 5 tidak muncul dan yang tersering adalah alel 9. Pada populasi Portugis yang diteliti oleh Corte-Real, 1999 muncul 6 alel, yang tersering adalah alel 9.3 sedangkan alel 5 dan 11 tidak muncul.

Data polimorfisme DNA di Surabaya sebagaimana di Indonesia sampai saat ini belum ada, padahal data ini sangat penting dalam kasus *paternitas disputed* dan identifikasi baik untuk korban hidup maupun korban meninggal. Data polimorfisme VNTR lokus D17S5, D1S80 dan D16S83 pernah dilakukan pada populasi Surabaya, sedangkan polimorfisme STR belum pernah dibuat (Kusuma, 2003)

Populasi menurut Glinka (1992) ; Herniyati (1999) adalah sekelompok individu dari spesies yang sama, menghuni satu teritori dan saling kawin-mawin serta dalam perkawinan itu terisolasi dari kelompok yang lain. Suatu populasi memiliki *gene pool* atau jumlah genotip dalam suatu populasi yang sama.

Indonesia termasuk dalam ras Mongoloid. Glinka (1996) membagi Indonesia dalam 4 kelompok besar dengan 9 cluster menurut kelompok 'wajah' dan etniknya. Namun saat ini sebagai akibat era globalisasi dan migrasi penduduk terjadi kawin campur antar berbagai populasi yang membentuk suatu populasi baru di tempat tinggalnya. Hal ini dalam bidang forensik odontologi mempersulit identifikasi seseorang berdasarkan populasi aslinya.

Populasi Batak berdomisili di sebelah utara Pulau Sumatera dan termasuk dalam kelompok Protomalayid. Sistem kekerabatan orang Batak adalah patrilineal dimana garis keturunan seorang lelaki diteruskan oleh anak laki-lakinya, dan menjadi punah kalau tidak ada anak laki-laki yang dilahirkan. Sistem kekerabatan inilah yang menjadi tulang punggung masyarakat Batak yang terdiri dari turunan, marga, dan

kelompok suku (Vergouwen, 1986). Pria Batak biasanya akan mempersunting wanita keturunan Batak pula, dan jika si wanita bukan keturunan Batak maka ia akan diberi marga sesuai marga ibu si pria melalui suatu upacara adat. Hal ini yang membuat jarangnya terjadi perceraian pada pernikahan populasi Batak karena suatu perceraian akan melibatkan kedua keluarga dan harus melewati suatu proses hukum dan upacara adat. Kebiasaan ini memungkinkan *gene pool* populasi Batak lebih asli.

Adalah merupakan kenyataan sejarah, bahwa beberapa dasawarsa terakhir ini populasi Batak telah menyebar luas ke berbagai daerah dan hampir di seluruh Nusantara. Ada yang tetap bertani dan banyak juga yang bekerja di luar pertanian. Mereka tinggal di kota besar, kota kabupaten dan kecamatan serta di pedesaan di berbagai sudut wilayah Republik Indonesia termasuk ke negara tetangga seperti Singapura dan Malaysia (Purba, 1997).

1.2. RUMUSAN MASALAH

Berdasar pada latar belakang tersebut di atas, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut : bagaimanakah pola alel lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya?

1.3. TUJUAN PENELITIAN

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pola alel lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui alel lokus HUMTH01 yang muncul untuk populasi Batak yang tinggal di Surabaya
2. Mengetahui frekuensi masing-masing alel lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya
3. Mengetahui ukuran basa DNA lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya sebagai bahan identifikasi forensik

1.4. MANFAAT PENELITIAN

1. Memperoleh informasi tentang pola alel lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya yang nantinya berguna untuk perkembangan studi populasi di Indonesia
2. Mengembangkan studi antropologi molekuler dalam bidang kedokteran forensik

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. DNA SEBAGAI METODE IDENTIFIKASI FORENSIK

Pada manusia dan organisme lainnya, asam nukleat adalah pembawa informasi genetik dan mempunyai struktur yang sesuai dengan fungsinya. Ada dua tipe asam nukleat yaitu DNA (*deoxyribonucleic acid*) dan RNA (*ribonucleic acid*) yang masing-masing mengandung *sugar-phosphate backbone* dengan ujung basa nitrogen. Basa nitrogen terdiri dari 2 tipe yaitu purin dan pirimidin. Pada DNA terdapat 2 basa purin yaitu adenine (A) dan guanine (G), dan 2 basa pirimidin yaitu timin (T) dan sitosin (C). Gula pada DNA adalah *deoxyribose*. Basa nitrogen terikat pada posisi 1' (*one prime*) dari masing-masing gula, dan *phosphate* berikatan dengan *group hydroxyl* 3' dan 5'. Setiap unit basa purin atau basa pirimidin bersama-sama dengan ikatan gula dan grup *phosphate* disebut dengan nukleotida (Connor, 1997).

Satu molekul DNA terdiri dari dua rantai nukleotida yang menyatu membentuk ikatan searah jarum jam *double helix* dengan 10 nukleotida untuk setiap putaran DNA. Kedua rantai berjalan dengan arah yang berlawanan (contohnya 5' ke 3' untuk yang satu dan 3' ke 5' untuk lainnya) dan menyatu oleh ikatan hidrogen antara A di rantai satu dan T di rantai lain atau antara G dan C (Connor, 1997).

Untaian DNA berikatan nonkovalen melalui ikatan hidrogen antara basa dari untaian lawannya, yang membentuk *base pair*. Dalam DNA *double helix* terdapat sekitar 10 *base pairs* per putarannya (Turner, 2000). Panjang keseluruhan DNA dalam haploid kromosom adalah 3000 Mb ($3x10^9$bp) dengan jarak antar *base pairs* dalam DNA *helix* adalah 0,34 nm, sehingga panjang haploid DNA jika direntangkan sekitar 1 meter (Connor, 1997)

Jaringan tubuh mempunyai jumlah DNA yang berbeda tergantung dari struktur dan komposisi sel. Jaringan yang mempunyai banyak sel berinti dan sedikit

sangat penting dalam memilih organ yang akan diisolasi DNAnya dalam kasus forensik. Dalam kasus yang sudah lama dimana yang tersisa hanyalah jenasah atau tengkorak, maka hanya tulang dan gigi yang dapat diperiksa (Atmadja, 1996 ; Indrayana 2000).

DNA dapat diisolasi dan dimurnikan dari spesimen yang khusus atau potensial dalam laboratorium ilmu forensik termasuk darah, sperma, sel akar rambut, tulang, kulit, usus dan hapusan rongga mulut atau vagina, yang sesuai dengan standard protokol laboratorium dan panduan yang direkomendasikan oleh TWGDAM (proteinase K digestion pada suhu 56° C, ekstraksi phenol-chloroform dan filtrasi-konsentrasi dengan Microcon-100 microconcentrator (Amicon, Beverly MA) (Ladd et.al, 1996).

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu metode dimana sekuen DNA target ditambahkan dengan DNA polimerase yang tepat. Termasuk didalamnya adalah memakai primer yang tepat untuk mengaktivasi polimerase agar dapat mengamplifikasi sekuen DNA sehingga akan melepas DNA dengan pita ganda menjadi DNA pita tunggal dengan menggunakan pemanasan. Proses ini diulang sebanyak n kali untuk mendapatkan hasil akhir penggandaan sebesar 2^n dari sekuen DNA aslinya (Yamamoto, 1996), atau dengan kata lain PCR digunakan untuk mengamplifikasi suatu sekuen DNA menggunakan sepasang *oligonucleotide primer* yang masing-masing melengkapi satu ujung dari sekuen DNA target. Kemudian DNA ini akan memanjang ke arah pasangannya yang dikerjakan oleh *thermostable DNA polymerase* dalam tiga rangkaian tahapan yaitu : denaturasi, *primer annealing* dan polimerisasi (Turner, 2000). Sepasang *oligonucleotide* sekitar 18-30 nukleotida dengan kandungan G+C yang sama akan bertindak sebagai PCR primer asalkan dapat mensintesa DNA dari kedua ujungnya (Turner, 2000).

Agarose merupakan derivat polisakarida dari ganggang laut yang membentuk gel solid dalam larutan air pada konsentrasi antara 0,5% sampai 2% (w/v). Agarose yang digunakan untuk *electrophoresis* lebih murni daripada agar yang digunakan untuk kultur bakteri. Jika ditambahkan arus listrik pada gel agarose dalam larutan buffer sehingga terjadinya aliran listrik, fragmen DNA akan bergerak melalui gel ke arah elektroda positif karena DNA mengandung elektron negatif. Sampel DNA diletakkan dalam sumuran pada permukaan gel dan akan bergerak sepanjang lintasan dalam gel (Turner, 2000).

2.2. POLIMORFISME DNA

Polimorfisme DNA adalah suatu istilah yang digunakan untuk menunjukkan adanya suatu bentuk yang berbeda dari satu struktur dasar yang sama (Atmaja, 1992; Kusuma, 2004). atau menurut *medical dictionary* polimorfisme DNA adalah suatu keadaan dimana satu atau dua perbedaan yang normal dari sekuen nukleotida dapat muncul pada bagian DNA yang khusus. Jika suatu modifikasi terjadi pada suatu lokus spesifik dalam suatu populasi, maka lokus tersebut dikatakan polimorfik. Suatu lokus baru dapat dikatakan sebagai polimorfik jika alel yang paling sering ditemukan frekuensinya kurang dari 99% pada lokus yang bersangkutan, dimana menurut hukum Hardy Weinberg sekurangnya 2% dari populasi harus heterozigot pada lokus tersebut (Budowle et al, 1991 ; Kusuma, 2004).

Perubahan DNA yang terjadi pada dasarnya sangatlah bervariasi yakni mulai dari perubahan pada satu basa nukleotida saja hingga perubahan jumlah urutan pada basa yang berulang. Perubahan ini bisa bersifat nyata (mengubah fenotip) tetapi juga bisa bersifat netral yang artinya bahwa perubahan tersebut hanya mengubah genotip saja. Dengan demikian secara garis besar polimorfisme DNA dapat dibagai dalam 2 kelompok besar yaitu polimorfisme yang terjadi akibat perubahan urutan basa

nukleotidanya, dan polimorfisme yang terjadi karena adanya perbedaan panjang fragmen DNA hasil pemotongan dengan enzim restriksi (*Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP)* (Kusuma, 2004).

Polimorfisme akibat perubahan urutan basa adalah suatu polimorfisme yang terjadi sebagai akibat adanya mutasi karena pengaruh lingkungan yang menyebabkan terjadinya perubahan pada suatu urutan basa tertentu. Polimorfisme yang terjadi pada keadaan ini dapat dideteksi dengan pemeriksaan sekuensing langsung pada urutan basa yang ada. Sedangkan polimorfisme akibat perbedaan panjang basa adalah perubahan yang terjadi pada DNA dimana terdapat bagian DNA yang biasanya dapat dipotong oleh enzim restriksi endonuklease menjadi tidak dapat dipotong lagi. Akibatnya terjadi perbedaan panjang DNA setelah pemotongan dengan enzim restriksi dan kondisi ini dapat diamati pada *electrophoresis* yakni berupa pita fragmen yang berbeda lokasinya. Kebanyakan mutasi ini tidak menimbulkan perubahan fenotip karena terjadi di daerah *noncoding* namun seperti nukleotida lainnya maka perubahan ini dapat diturunkan dari orang tua kepada anaknya (Atmaja, 1992 ; Kusuma 2004).

Perbedaan atau variasi urutan basa dalam DNA di dalam setiap sel manusia ini dikenal dengan sifat polimorfisme, yang diduga terjadi akibat adanya pertukaran yang tidak sama (*unequal exchange*) pada mitosis dan meiosis atau akibat *slippage* DNA selama proses replikasi (Jeffrey et al, 1985 ; Kusuma, 2004). Hal ini dimanfaatkan oleh dunia forensik untuk dijadikan sebagai dasar bagi uji DNA di bidang forensik termasuk dalam hal ini yang berkaitan dengan *parentage disputed* yang pertama kalinya dimulai pada tahun 1985 melalui sebuah metode yang dikenal dengan teknik *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP).

2.3. SHORT TANDEM REPEAT

Sekitar 60.000-70.000 gen terdapat pada DNA manusia. Masing-masing gen biasanya hanya mempunyai satu duplikat pada gen haploid dan kelompok duplikat gen ini dan siklus regulasinya berjumlah 70% dari keseluruhan DNA (diprediksi ukuran gen sekitar 30 kb). Sisa 30% dari DNA adalah *repetitive* dan tidak mempunyai fungsi mensintesa protein (*noncoding*). *Repetitive* DNA dibagi menjadi *tandem repeats* (*satellite DNA*) yang dibagi menurut panjangnya dan pengulangan berurutan satu dengan lainnya secara langsung dan *interspersed repeats* yang muncul sebagai *multiple copies* terpencar di sepanjang gen (Connor, 1997 ; Turner, 2000). Satelit DNA terbagi menjadi *minisatellite (Variable Number Tandem Repeats, VNTR)* dan *microsatellite (Short Tandem Repeat, STR)*. VNTR lebih sering ditemukan dekat ujung kromosom sedangkan STR lebih banyak terdistribusi sepanjang kromosom (Turner, 2000).

Short Tandem Repeat atau STR disebut juga *'microsatellite'* merupakan daerah DNA dengan *core sequences* antara 3 sampai 7 *basepairs* (Rose et al, 1990; Kusuma, 2004). *Microsatellite repeats* kurang dari 1 kb dan motif *repeat* yang sering muncul adalah A, AC, AAAN (dimana N bisa nukleotida apa saja), AAN dan AG. Jumlah *repeat* untuk kromosom yang bersangkutan biasanya berbeda dan perbedaan umum genetik ini atau *polymorphisms* dapat digunakan untuk melacak pewarisan dari bagian tersebut untuk masing-masing kromosom (Connor,1997).

Lokus-lokus STR mengandung *repeat sequences* berurutan yang simple sepanjang 1 – 6 *basepairs*. Sama dengan lokus-lokus *variable number of tandem repeats* (VNTR) atau *minisatellite*, beberapa lokus STR menunjukkan panjang polimorfisme yang berbeda antar individu karena variasi jumlah unit *repeat*nya. Lokus-lokus STR ditemukan dalam jumlah yang besar sepanjang *human genome* dan biasanya ditemukan setiap 6 sampai 10 kb (Beckman, 1992 ; Roy, 1996).

Karena lokus-lokus STR memiliki ukuran alel yang kecil (biasanya kurang dari 300 bp) maka dapat diamplifikasi dengan mudah dengan PCR dan sampel yang telah terdegradasipun dapat dianalisa. Alelnya dapat dipisahkan dengan *polyacrylamide gel electrophoresis*, yang mampu memisahkan produk amplifikasi yang variasi ukurannya satu basa, sehingga memungkinkan identifikasi alel secara akurat dan memecahkan masalah yang berhubungan dengan model distribusi alel pada analisis VNTR (Gill, 1991 ; Roy, 1996).

STR DNA *profiling* dapat dikerjakan dalam beberapa hari, lebih pendek daripada RFLP yang memerlukan waktu beberapa minggu. Analisis STR saat ini digunakan untuk identifikasi forensik (Sullivan, 1992 ; Roy, 1996). *Genetic typing* dari lokus polimorfik *microsatellite* (STR) merupakan alat yang bagus dan efisien dalam *forensic stain typing* dari kasus kriminal juga kasus identifikasi dan paternitas (Edwards, 1991 ; Waiyawuth, 1998). DNA typing menggunakan lokus *short tandem repeat* (STR) merupakan metode pilihan dalam analisis noda forensik. Lokus autosomal STR menunjukkan warisan tipe Mendelian dari dua alel kodominan yang nampak pada masing-masing lokus dan merupakan sasaran rekombinasi normal dan mutasi (Schneider, 1998).

FBI telah mendisain 13 lokus STR untuk digunakan sebagai sistem identifikasi forensik nasional dengan bersinergi dengan *Combined DNA Index System* (CODIS) *database* yaitu: TH01, TPOX, CSF1PO, vWA, FGA, D3S1358, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, D8S1179, D18S51, dan D21S11, ditambah dengan marker amelogenin yang digunakan untuk menentukan jenis kelamin (Butler et al, 2003 ; Kusuma, 2004). Adapun menurut *European DNA Profiling Group (*EDNAP*)* dan rekomendasi *European Network of Forensic Science Institute* (ENFSI), pada pertemuan kerja Interpol tahun 1997, terdapat 4 standar lokus-lokus STR yang digunakan yaitu : HUMTH01, HUMVWFA31, D21S11, dan

HUMFIBRA/FGA, ditambah dengan lokus D3S1358, D8S1179 dan D18S51 (Sadad, 2004 ; Kusuma, 2004).

2.4. LOKUS HUMTH01

Menurut *Medical Dictionary* lokus adalah suatu tempat yang khusus, atau posisi yang ditempati oleh gen dalam kromosom. Setiap lokus mempunyai alel, yaitu satu dari serangkaian dua gen yang berbeda atau lebih yang menempati lokus yang sama dari satu kromosom yang spesifik. Kromosom autosom selalu sepasang, dimana masing-masing gen autosom digambarkan dua kali pada sel somatik. Jika alel yang sama menempati satu unit lokus, maka individu atau selnya adalah *homozygote* untuk alel tersebut. Jika alelnya berbeda, maka individu atau selnya adalah *heterozygote* untuk alel tersebut.

HUMTH01 (Human Tyrosine Hydroxylase, intron 1) merupakan lokus polimorfik *Short Tandem Repeat* (STR) (4bp- AATG) pada kromosom 11 p15.5-p15. HUMTH01 dapat dilihat dengan produk amplifikasi PCR silver staining yang dijalankan pada gel polyacrylamide secara horisontal (van Oorschot, 1996). Lokus ini berukuran antara 179 – 203 *basepairs* dengan variasi alel antara 5 sampai 11 (Promega Corp, 2000). Semua alel ukurannya berbeda setiap 1 unit *repeat* (4 *basepairs*) kecuali alel 9.3 ukurannya 1 bp lebih pendek dari alel 10 (Sueblinvong, 1999). Hal ini senada dengan Foreman dkk, 1998 yang menyatakan bahwa alel yang jarang dari lokus HUMTH01 ini yaitu 8.3 disebut sebagai alel 9 dan alel 10 lebih dikenal sebagai alel 9.3.

Ketepatan penelitian HUMTH01 telah dilaporkan pada beberapa bidang penelitian antara lain : lokasi kromosom dan sekuen alel (Polymeropoulos, 1991 ; van Oorschot, 1996), dan penelitian populasi (Edwards, 1992 ; van Oorschot, 1996). Metode *typing* HUMTH01 merupakan metode yang masuk akal, kuat dan efisien

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

sehingga merupakan metode yang bermanfaat pada kasus-kasus forensik (van Oorschot, 1996).

Wiegand et al 1993 ; van Oorschot, 1996 menunjukkan bahwa HUMTH01 dapat dihasilkan melalui ekstraksi DNA dari noda yang terdegradasi sangat parah yang terpapar terhadap berbagai temperatur dengan waktu yang bervariasi, dan noda dari kasus dimana hasil dari metode RFLP dan AmpFLPnya negatif.

Berdasarkan penelitian Corte-Real dkk 1999, didapatkan perbedaan nilai genotip dari lokus HUMTH01 antara populasi Madeira Archipelago dan populasi : Galicia di Spanyol, Basel di Switzerland, SW Germany, Caucasian di Austria, Caucasian di Britain, Denmark, North Poland, Zagreb di Croatia, Hongaria, Jepang, Cina Selatan, Quechua Amerindians di Bolivia dan Greenland Eskimo. Penelitian tentang lokus HUMTH01 pada beberapa negara menunjukkan adanya perbedaan alel yang muncul. Penelitian pada populasi Thailand yang tinggal di Thailand menurut Sueblinvong dkk, 1999 muncul 6 alel dimana yang paling sering adalah alel 9 sedangkan alel 5 dan 11 tidak muncul. Pu dkk, 1999 meneliti populasi Thailand yang tinggal di Taiwan muncul 7 alel dimana yang tersering adalah alel 9 sedangkan alel 11 tidak muncul. Penelitian Pu dkk, 1999 pada populasi Taiwan muncul 8 alel dan yang tersering adalah alel 9 sedangkan pada populasi Philippine yang tinggal di Taiwan alel 5 tidak muncul dan yang tersering adalah alel 9. Pada populasi Portugis yang diteliti oleh Corte-Real, 1999 muncul 6 alel, yang tersering adalah alel 9.3 sedangkan alel 5 dan 11 tidak muncul.

2.5. POPULASI BATAK

Ras Indonesia merupakan percampuran antara ras Caucasoid dari India, Iran, Arab dan Belanda, dan ras Mongoloid dari Cina dan Jepang dengan sedikit percampuran ras Negrid dari Afrika barat (Jacob, 1990).

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Menurut Glinka,1996 ; Herniyati, 1999 populasi adalah sekelompok individu dari spesies yang sama yang menghuni satu teritori dan saling kawin-mawin serta dalam perkawinan itu terisolasi dari kelompok yang lain. Yang amat penting dalam populasi adalah bahwa populasi memiliki *gene pool* yang sama. Istilah populasi paling aman dipergunakan dalam penelitian pada kelompok tertentu.

Glinka, 1981 ; Herniyati, 1999 membedakan empat ras di kawasan Indonesia dan membaginya menjadi 9 kelompok (cluster) yaitu ras Deuteromalayid, ras Dayakid, ras Protomalayid dan ras Melanesid. Ras Deuteromalayid menduduki kawasan barat dan sebagian utara Indonesia; ras Dayakid menduduki pedalaman Kalimantan; ras Protomalayid menghuni kawasan tenggara dan ras Melanesid menduduki khususnya Irian Jaya.

Populasi Batak berdomisili di sebelah utara Pulau Sumatera dan termasuk dalam kelompok Protomalayid. Menurut sejarah, kakek moyang suku bangsa Batak pada mulanya berdiam di sekitar danau Toba. Perkampungan leluhur mereka (Siraja Batak) adalah Sianjur Mula-mula, di kaki gunung Pusuk Buhit (Hutagalung, 1926; Purba, 1997) tidak berapa jauh dari kota Pangururan sekarang. Dari tempat inilah keturunannya menyebar, mula-mula ke daerah sekitarnya dan lambat laun ke seluruh penjuru Tanah Batak (Purba, 1997).

Sistem kekerabatan orang Batak adalah patrilineal dimana garis keturunan seorang lelaki diteruskan oleh anak laki-lakinya, dan menjadi punah kalau tidak ada anak laki-laki yang dilahirkan. Sistem kekerabatan inilah yang menjadi tulang punggung masyarakat Batak yang terdiri dari turunan, marga, dan kelompok suku (Vergouwen, 1986) sehingga *gene pool*nya lebih asli. Pada awalnya nama yang dimiliki kakek moyang orang Batak belum merupakan marga. Hubungan sumbang yang terjadi di dalam satu alur keturunan telah mengakibatkan pecahnya hubungan saudara. Pada generasi berikutnya barulah muncul istilah marga. Dengan adanya

marga hubungan kekerabatan menjadi lebih jelas dan setidaknya dapat memperkecil kemungkinan perkawinan satu marga (Purba, 1997).

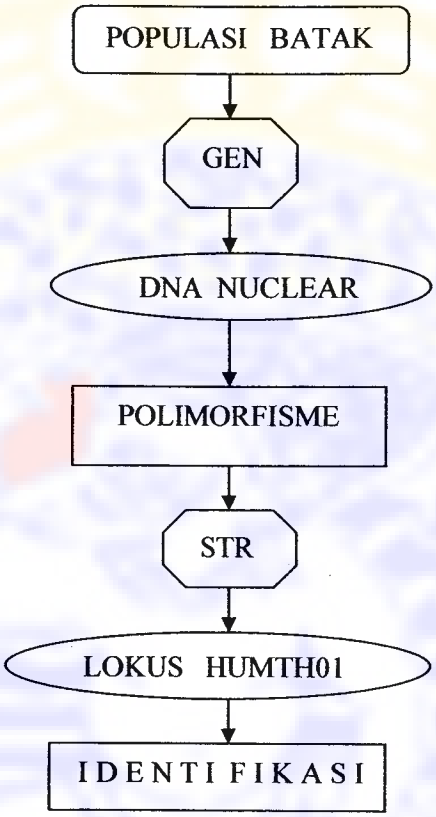
Dilihat dari sejarah terjadinya, fungsi marga tersebut sangat besar artinya dalam hubungan masyarakat Batak. Menurut Hutagalung, 1961 ; Purba, 1997 selain berfungsi untuk mengatur, diantaranya agar jangan terjadi perkawinan antara yang sedarah, juga untuk mengatur hubungan antara berbagai pihak sebagai akibat kompleksnya hubungan di antara keturunan serta untuk mengurangi konflik dan hal negatif lainnya.

Adalah merupakan kenyataan sejarah, bahwa beberapa dasawarsa terakhir ini populasi Batak telah menyebar luas ke berbagai daerah dan hampir di seluruh Nusantara. Ada yang tetap bertani dan banyak juga yang bekerja di luar pertanian. Mereka tinggal di kota besar, kota kabupaten dan kecamatan serta di pedesaan di berbagai sudut wilayah Republik Indonesia termasuk ke negara tetangga seperti Singapura dan Malaysia (Purba, 1997).

Diidentifikasi terdapat 6 faktor, yaitu faktor fisik geografis termasuk kesuburan tanah dan iklim, faktor sosial demografi, faktor pendidikan, faktor politik, faktor ekonomi dan pembukaan jaringan perhubungan yang turut mempengaruhi perpindahan tersebut (Purba, 1997).

BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL

KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN



Menurut Glinka, 1996 ; Herniyati, 1999 populasi adalah sekelompok individu dari spesies yang sama yang menghuni satu teritori dan saling kawin-mawin serta dalam perkawinan itu terisolasi dari kelompok yang lain. Yang amat penting dalam populasi adalah bahwa populasi memiliki *gene pool* yang sama. Istilah populasi paling aman dipergunakan dalam penelitian pada kelompok tertentu.

DNA nukleus terdiri dari 2 rantai nukleotida yang menyatu membentuk rantai *double helix* dimana masing-masing unit terdiri dari *sugar phosphate backbone* yang berikatan dengan basa nitrogen. Gula dari DNA adalah gula

deoxyribosa, sedangkan basa nitrogen terbagi atas basa purin yaitu adenine (A) dan guanine (G) dan basa pirimidin yaitu timin (T) dan sitosin (C) (Connor, 1997).

Panjang keseluruhan DNA dalam haploid kromosom adalah 3000 Mb ($3x10^9$bp) dengan jarak antar *base pairs* dalam DNA *helix* adalah 0,34 nm, sehingga panjang haploid DNA jika direntangkan sekitar 1 meter (Connor, 1997)

Polimorfisme adalah suatu istilah yang digunakan untuk menunjukkan adanya suatu bentuk yang berbeda dari satu struktur dasar yang sama (Atmaja, 1992). Jika suatu modifikasi terjadi pada suatu lokus spesifik dalam suatu populasi, maka lokus tersebut dikatakan polimorfik.

HUMTH01 (Human Tyrosine Hydroxylase, intron 1) merupakan lokus polimorfik *Short Tandem Repeat* (STR) (4bp- AATG) pada kromosom 11 p15.5-p15 (van Oorschot, 1996).

Identifikasi dalam bidang forensik adalah membandingkan antara data *antemortem* dan data *post mortem.*

BAB 4. MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1.JENIS PENELITIAN

Observasional laboratoris

4.2.RANCANGAN PENELITIAN

Cross Sectional

4.3.POPULASI, BESAR SAMPEL DAN TEKNIK PENGAMBILAN SAMPEL

POPULASI adalah populasi Batak yang tinggal di Surabaya

BESAR SAMPEL ditentukan dengan rumus Daniel (1991)

$$n = \frac{N.\ z^2 . p . q}{d^2.\ (N-1) + z^2.p.q}$$

dimana : N = 8000

z = 1,96

p = 0,5

q = 0,5

d = 15%

dari hasil perhitungan dengan rumus tersebut diperoleh n = 42

TEKNIK PENGAMBILAN SAMPEL dengan *simple random sampling*

4.4. VARIABEL PENELITIAN

Variabel yang diteliti adalah pola polimorfisme lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya

4.5.BAHAN PENELITIAN

Hapusan mukosa bukal dari sampel

Trizol, Chloroform, Isopropanol, Alkohol 70%, DW

PCR Mix, mineral oil, PCR Primer dari Promega dengan rumus :

5´-GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT-3´

5´-ATTCAAAGGGTATCTGGGCTCTGG-3´

Methanol 20%, Glycerol 2%, Aethanol 10%, Acetic acil glacial 5%, Ag NO3 0,1%, Na OH 1,5% dan formalin

4.6.INSTRUMEN PENELITIAN

Microcentrifuge tube

Whirlmixer

Spinmillipore

Minicycler

UV-1601 UV-visible Spectrophotometer

4.7.LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Lokasi penelitian di Tropical Disease Centre (TDC) Unair

Waktu penelitian bulan April – Juni 2005

4.8.PROSEDUR PENGAMBILAN DATA

SAMPEL : Mula-mula dicari kelompok marga Batak dan ditelusuri keluarga atau individu yang telah menetap di Surabaya sekurangnya 20 tahun dengan tidak ada kawin campur 2 generasi di atasnya. Individu yang cocok dengan kriteria diminta mengisi kuesioner dan pernyataan persetujuan sebagai subyek penelitian, kemudian dilakukan pengambilan sampel sel dengan hapusan mukosa bukal kiri dan kanan dari subyek.

ISOLASI DNA dengan metode Trizol:

1. 1 µl Trizol ditambahkan dengan hapusan mukosa bukal, vortex sampai homogen kurang lebih 5' kemudian diinkubasi selama 5' pada suhu kamar

2. Tambahkan 0,2 µl chloroform, vortex kemudian inkubasi selama 3'
3. Centrifuge 16000 rpm selama 15' pada suhu 4° C
4. Ambil phase bagian atas dan pindahkan ke dalam tabung Eppendarf baru steril
5. Tambahkan 1,5 µl isopropanol, bolak balik pelan-pelan kemudian inkubasi selama 10' pada suhu kamar
6. Centrifuge 16000 rpm selama 10' pada suhu 4° C
7. Buang supernatant
8. Cuci pellet dengan alcohol 70% kemudian dicentrifuge 16000 rpm selama 5' kemudian alkohol dibuang dan dikeringkan
9. Larutkan pellet dengan DW 20 µl, vortex
10. Kemudian DNA dihitung dengan UV absorbance spectrophotometry (pada 260 nm).

PCR Protocol : sejumlah 2 µl DNA genome (1 ng/µl) ditambahkan dengan PCR Mix 12,5 µl, PCR primer TH01 A 2,5 µl, PCR primer TH01 B 2,5 µl, kemudian divortex dan dispin. Tambahkan mineral oil 1 tetes kemudian dimasukkan dalam Minicycler dan diputar dengan program 11 untuk TH01 :

96° C selama 2'

94° C selama 1'

61° C selama 1'

70° C selama 1' 30"

dilakukan pengulangan sebanyak 10 kali, kemudian dilanjutkan dengan

90° C selama 1'

61° C selama 1'

70° C selama 1' 30"

dilakukan pengulangan sebanyak 20 kali.

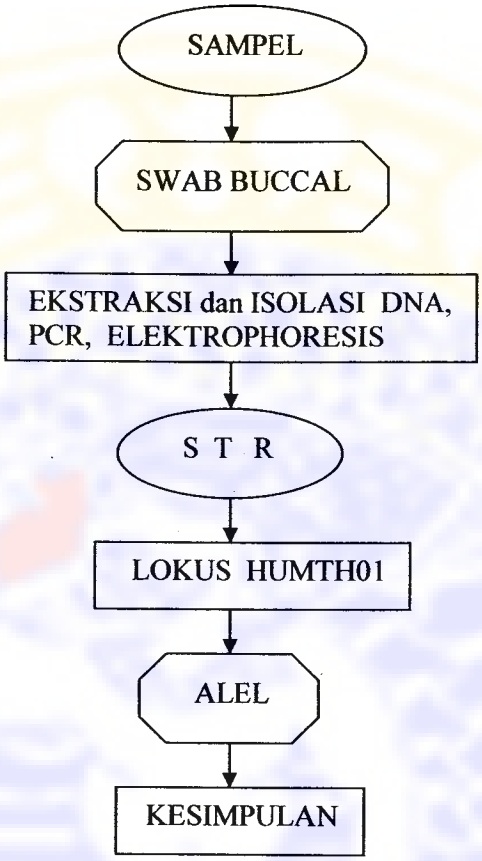
ELECTROPHORESIS :

1. Gel agarose dibuat dari TBE 0,5% + agarose 0,5 ml. yang dimasak dalam microwave kemudian didinginkan sampai suhu 50° C
2. Kemudian ditambahkan Acrylamid bis 3,5 µl dan Temed 15 µl
3. DNA hasil PCR 12,5 µl + loading 2 µl dimasukkan dan dirunning pada buffer 200 volt. Digunakan marker 100bp dan marker K562.
4. Pengecatan Polyacrilamide – Agarose Composite gel, dilakukan drying dengan methanol 20% + glycerol 2% selama 5'
5. Difiksasi dengan aethanol 10% + Acetic acil glacial 5% selama 20', kemudian cuci cepat dengan DW
6. Staining dengan Ag NO3 0,1% selama 60', cuci dengan DW
7. Developing dengan Na OH 1,5% + formalin 100 µl, kemudian lihat di atas lampu sampai pita tampak jelas

4.9.CARA PENGOLAHAN DAN ANALISIS DATA

Data berupa alel lokus HUMTH01 yang muncul untuk masing-masing sampel. Kemudian dikelompokkan alel yang sering muncul dan berapa frekuensi untuk masing-masing alel lokus HUMTH01 yang muncul.

ALUR PENELITIAN



Definisi operasional :

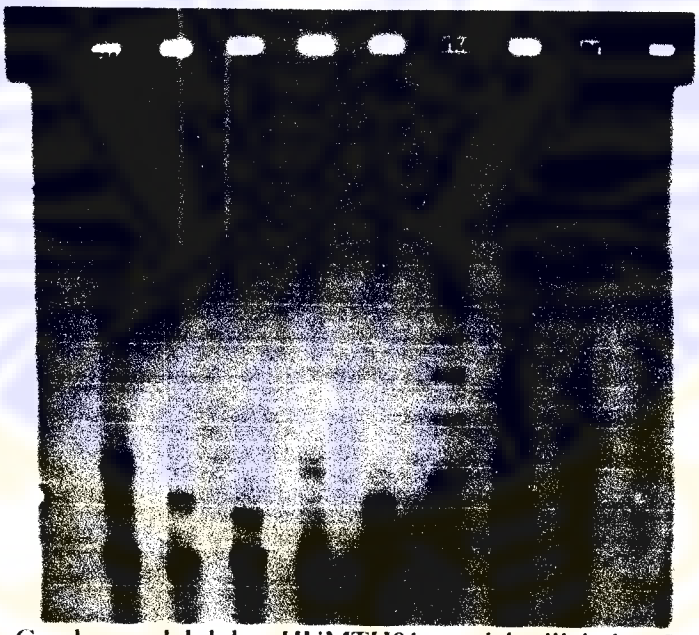
Pola alel lokus HUMTH01 adalah pola yang menggambarkan berapa *basepair* basa lokus HUMTH01. Alel yang muncul dari hasil electrophoresis terlihat sebagai pita pada marker antara 179 sampai 203 bp. Dilihat letak pita dari masing-masing sampel terhadap marker 100 bp, terhadap kontrol K562 yang setara dengan alele 9,3 serta terhadap alel marker CTT multiplex dimana alel terbagi dari alel 5 sampai alel 11.

BAB 5. ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1. Data Penelitian

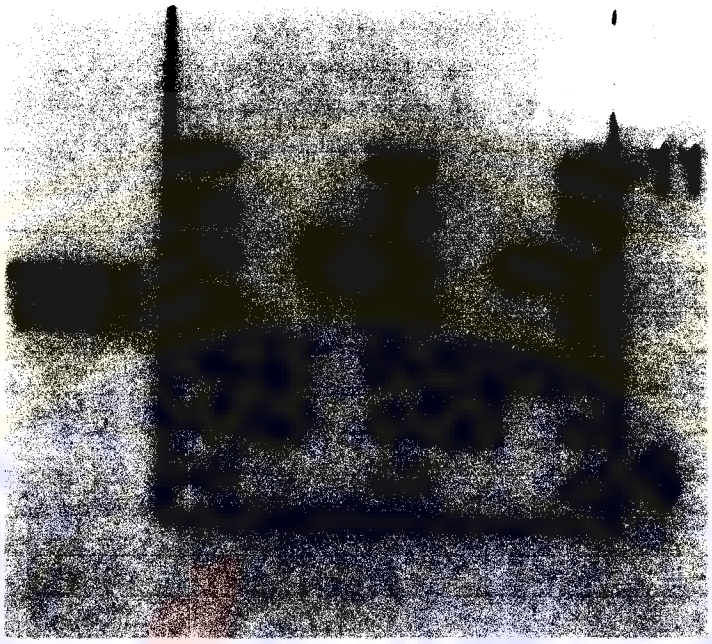
Telah dilakukan penelitian pada 45 orang Batak yang tinggal di Surabaya dengan metode pengambilan sampel berupa hapusan mukosa bukal. Dari hasil PCR ternyata 3 sampel gagal didapatkan DNA *product*nya sehingga total 42 sampel yang dapat dilakukan *electrophoresis* untuk menentukan alel lokus HUMTH01.

Dari hasil *electrophoresis* yang berupa pita, ditentukan apakah yang muncul adalah lokus HUMTH01 dengan menarik garis pita dari sampel ke arah marker 100 bp, dimana lokus HUMTH01 berada antara 100 sampai 200 bp. Kemudian ditarik garis searah dengan marker K562 untuk menentukan apakah pita dari sampel berada pada alel 9.3 (gambar 1). Jika posisi pita dari sampel di atas atau di bawah dari marker K562 dipakai *alele marker* dari CTT untuk menentukan letak alel dari sampel (gambar 2).



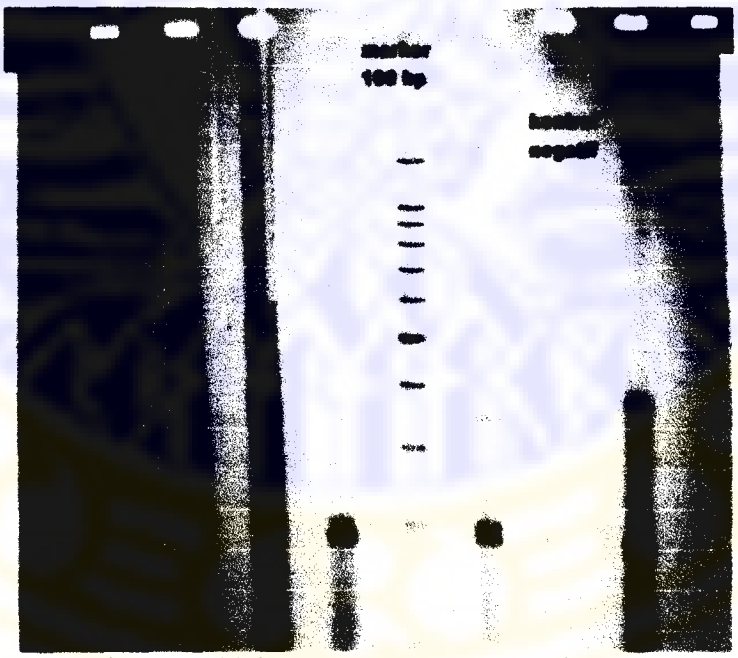
Gambar 1. Gambaran alel lokus HUMTH01 setelah dilakukan PCR. Garis ke-6 adalah *marker ladder* 100bp, dan garis paling kanan adalah kontrol alel K562

MILIK PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA



Gambar 2. Marker alele HUMTH01 dari marker CTT multiplex yang menggambarkan letak alel antara 5 sampai 11 dengan perbedaan antar alel sebesar 4 bp

Untuk mengetahui apakah pemeriksaan PCR ini terkontaminasi atau tidak maka dilakukan PCR kontrol dengan memakai air untuk kontrol negatif dan marker K562 untuk kontrol positif (gambar 3).



Gambar 3. Gambaran alel lokus HUMTH01 setelah dilakukan PCR. Pada garis ke-5 adalah *marker ladder* TH01, sedangkan garis ke-7 adalah kontrol negatif dan garis ke-8 adalah kontrol positif dari marker K562

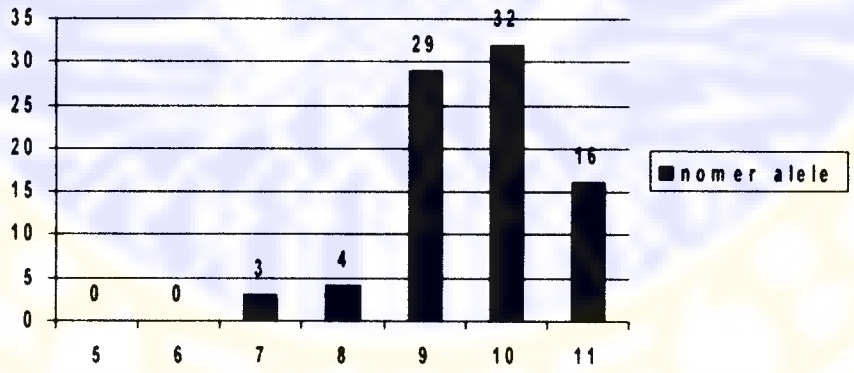
5.2. Analisis dan Hasil Penelitian

Dari hasil pemeriksaan alel lokus HUMTH01 alel yang mucul adalah 5 alel dari 7 alel lokus ini.

Tabel 1. Frekuensi alele lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya

Nomer alele	Jumlah	Frekuensi (%)
5	0	0
6	0	0
7	3	3,57
8	4	4,76
9	29	34,52
10	32	38,1
11	16	19,05
Total	84	100

Dari keseluruhan 7 alel lokus HUMTH01 didapatkan 5 alel yaitu alele 7, 8, 9, 10 dan 11, sedangkan alel 5 dan 6 tidak ditemukan (gambar 4). Frekuensi terbesar adalah alel 10 (38,1%) kemudian alel 9 (34,52%). Alel 11 sebesar 19,05% dan alel 7 dan 8 hanya sebesar 3,57% dan 4,76% (tabel 1).



Gambar 4. Hasil PCR lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya. Dari 7 alel hanya 5 alel yang muncul yaitu alel 7,8,9,10, dan 11.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Tabel 3. Perbandingan pasangan-pasangan alel lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya

Pasangan alel	Jumlah sampel	Frekuensi (%)
7 , 7	1	2,38
7 , 8	1	2,38
8 , 9	2	4,76
8 , 10	1	2,38
9 , 9	10	23,81
9 , 10	6	14,29
9 , 11	1	2,38
10 , 10	8	19,05
10 , 11	9	21,43
11 , 11	3	7,14
Total	42	100

BAB 6. PEMBAHASAN

Identifikasi forensik berdasarkan analisis DNA digunakan sebagai bukti fisik dalam penyelidikan kasus kejahatan seperti penyerangan, perkosaan dan pembunuhan pada dekade ini. Baik untuk alasan hukum dan psikologis, identifikasi pasti dari korban sangat diperlukan dan kadang-kadang berhasil dilakukan dengan metode sains tradisional dengan membandingkan radiografi gigi, mencocokkan sidik jari dan atau melakukan pemeriksaan tulang. Namun karena cepatnya pembusukan jaringan lunak, disartikulasi dan kerusakan kunci *skeletal landmark,* dan tidak adanya data sebelum kematian, maka cara tradisional ini tidak berguna. Perkembangan analisis DNA saat ini dan aplikasinya dalam identifikasi bukti biologis telah merubah kemampuan identifikasi jenasah (Rankin, 1996).

Sampel forensik sering sudah terdegradasi dan jumlahnya sangat sedikit sehingga sulit untuk dianalisa secara konvensional dengan analisa *restriction fragment length polymorphism (RFLP).* Amplifikasi sampel tersebut dengan metode PCR dapat menghasilkan informasi identitas genetik individual. Lokus *short tandem repeat (STR)* mempunyai ukuran alel yang kecil sehingga dapat diamplifikasi dengan mudah melalui PCR dan sampel yang terdegradasi dapat dipertanggung jawabkan hasil analisanya. Alel ini dapat dipisahkan dengan *polyacrylamide gel electrophoresis* dan mampu menghasilkan produk amplifikasi dengan ukuran yang bervariasi sampai satu basa, jadi memungkinkan identifikasi alel yang akurat dan menjawab masalah model distribusi alel yang berkesinambungan pada analisis *variable number of tandem repeat (VNTR).* Hasil STR DNA dapat diselesaikan dalam beberapa hari dibandingkan analisis RFLP yang memerlukan waktu beberapa minggu. Analisis STR saat ini digunakan untuk identifikasi forensik (Roy, 1996).

Short Tandem Repeat (STR) disebut juga *'microsatellite'* yang merupakan DNA dengan *core sequences* antara 3 sampai 7 bp (Rose dkk, 1990; Kusuma, 2004). *Microsatellite repeats* kurang dari 1 kb dan motif *repeat* yang sering muncul adalah A, AC, AAAN (dimana N bisa nukleotida apa saja), AAN dan AG (Connor, 1997), lokasinya lebih banyak terdistribusi sepanjang kromosom (Turner, 2000).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui alel lokus HUMTH01 yang muncul pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya dan untuk mengetahui frekuensi dari masing-masing alel. Lokus HUMTH01 merupakan lokus polimorfik STR pada kromosom 11 p15.5-p15. Lokus ini didapat dari produk amplifikasi PCR dengan pengecatan *silver staining* yang dijalankan pada *polyacrilamide gel* secara horizontal. Validasi penelitian HUMTH01 telah dilaporkan pada bidang penelitian : lokasi kromosom dan sekuen alel (Polymeropoulos dkk, 1991), tipe pewarisan menggunakan studi keluarga (Edwards dkk, 1992), kemampuan diproduksi, konsistensi dan sensitivitas (Gill dkk, 1994), spesifikasi spesies (van Oorschot dkk, 1994), dan studi populasi (Edwards dkk, 1992) dari van Oorschot, 1996. Lokus ini merupakan salah satu lokus dari 13 lokus STR yang telah didisain oleh FBI untuk digunakan sebagai sistem identifikasi forensik nasional dengan bersinergi dengan *Combined DNA Index System* (CODIS) *database* yaitu: TH01, TPOX, CSF1PO, vWA, FGA, D3S1358, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, D8S1179, D18S51, dan D21S11, ditambah dengan marker amelogenin yang digunakan untuk menentukan jenis kelamin (Butler et al, 2003 ; Kusuma, 2004). Juga menurut *European DNA Profiling Group (*EDNAP*)* dan rekomendasi *European Network of Forensic Science Institute* (ENFSI), pada pertemuan kerja Interpol tahun 1997, merupakan 4 standar lokus-lokus STR yang digunakan yaitu : HUMTH01, HUMVWFA31, D21S11, dan HUMFIBRA/FGA, ditambah dengan lokus D3S1358, D8S1179 dan D18S51 (Sadad, 2004 ; Kusuma, 2004).

Metode typing HUMTH01 merupakan metode yang masuk akal, kuat dan efisien sehingga merupakan metode yang bermanfaat pada kasus-kasus forensik (van Oorschot, 1996). Wiegand dkk, 1993 ; van Oorschot, 1996 menunjukkan bahwa HUMTH01 dapat dihasilkan melalui ekstraksi DNA dari noda yang terdegradasi sangat parah yang terpapar terhadap berbagai temperatur dengan waktu yang bervariasi, dan noda dari kasus dimana hasil dari metode RFLP dan AmpFLPnya negatif. Dalam penelitian ini dipilih lokus HUMTH01 ini karena selain hal-hal tersebut di atas, lokus ini juga efektif dalam penelitian populasi karena banyak penelitian populasi di beberapa negara menggunakan lokus ini sebagai salah satu lokus dalam penelitiannya seperti yang dilakukan oleh van Oorschot, 1996; Sueblinvong dkk, 1999; Pu dkk, 1999 dan Corte-Real, 1999.

Populasi Batak diambil sebagai sampel dalam penelitian ini karena populasi ini mempunyai aturan adat yang memungkinkan *gene pool* nya tetap sama. Selain itu populasi ini juga mewakili salah satu populasi di Indonesia sebagai penelitian awal yang nantinya dapat dilanjutkan dengan penelitian pada populasi lainnya.

Populasi ini mempunyai sistem kekerabatan patrilineal dimana garis keturunan seorang lelaki diteruskan oleh anak laki-lakinya (Vergouwen, 1986). Seorang laki-laki Batak harus memperistri wanita Batak juga, namun seiring dengan penyebaran penduduk antar daerah bahkan antar negara maka terjadilah pernikahan antar populasi. Namun untuk tetap mempertahankan adat maka istri yang berasal dari daerah lain harus diberi marga atau nama keluarga melalui suatu upacara adat. Tradisi ini selain membuat *gene pool* populasi Batak tetap murni juga mencegah terjadinya perceraian dalam pernikahan.

Populasi Batak saat ini telah menyebar luas ke berbagai daerah di seluruh Nusantara bahkan ke manca negara. Diidentifikasi terdapat 6 faktor yang memicu penyebarannya yaitu : faktor fisik geografis termasuk kesuburan tanah dan iklim,

faktor sosial demografi, faktor pendidikan, faktor politik, faktor ekonomi dan pemukaan jaringan perhubungan (Purba, 1997).

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini dengan menggunakan *simple random sampling. Simple random sampling* adalah cara pengambilan sampel yang memungkinkan setiap elemen dari populasi mempunyai kesempatan yang sama untuk menjadi sampel dan rancangan yang memungkinkan untuk membuat seleksi dari semua kombinasi yang mungkin dari kasus yang diteliti. Rancangan ini adalah dasar dari rancangan *probability sampling* dan syaratnya harus tersedia daftar dari setiap elemen populasi *(sample frame)* (Setijanto, 2002). Keuntungan teknik ini adalah harga rata-rata sampel merupakan estimator rata-rata populasi yang '*unbias*' dan pelaksanaannya mudah. Namun kelemahannya sampel dapat menyebar pada jarak yang jauh atau justru akan mengumpul pada area tertentu (Zainuddin, 2000).

Metode pengambilan sampel dengan hapusan mukosa bukal ternyata sangat efektif dan akurat untuk melihat lokus STR seperti dinyatakan oleh Ladd dkk, 1996. Bahan untuk pembuatan hapusan relatif mudah didapat dan dibuat sendiri. Mukosa bukal merupakan daerah dalam rongga mulut yang mempunyai lapangan yang luas, mudah dijangkau dan mudah dilihat. Dengan metode ini ternyata bisa didapatkan DNA yang memadai untuk melihat lokus STR. Karena metode ini tidak menimbulkan rasa sakit maka dapat dilakukan pada anak-anak bahkan bayi untuk kasus-kasus *parental disputed* atau kasus forensik lainnya.

Pada penelitian ini berdasarkan data dari kelompok marga Batak didapatkan 75 nama yang 2 generasi di atasnya tidak kawin campur, kemudian dari data ini diambil 50 orang untuk dilakukan pengambilan sampel berupa hapusan mukosa bukal karena yang 25 orang yang tidak memenuhi kriteria telah 20 tahun menetap di Surabaya. Selanjutnya ke-50 sampel ini dilakukan isolasi DNA dengan metode Trizol kemudian PCR dan *Electrophoresis.* Ternyata hanya 42 sampel yang

memberikan gambaran lokus HUMTH01 dengan baik, 8 sampel tidak didapatkan gambaran lokus ini, kemungkinan karena kesalahan peneliti yang kurang melakukan penekanan pada saat pengambilan hapusan mukosa bukal. Jumlah 42 sampel memenuhi syarat besar sampel dalam penelitian ini.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari 7 alel lokus HUMTH01 yang berukuran antara 179 – 203 bp pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya, hanya muncul 5 alel yaitu alel 7 (187 bp), alel 8 (191 bp), alel 9 (195 bp), alel 10 (199 bp) dan alel 11 (203 bp). Alel yang paling sering muncul adalah alele 10 sebanyak 32 sampel (38,1 %) kemudian alel 9 sebanyak 29 sampel (34,52 %). Alel 11 cukup sering muncul sebanyak 16 sampel (19,05 %), sedangkan alel 7 dan 8 hanya sebanyak 3 sampel (3,57 %) dan 4 sampel (4,76 %). Berdasarkan data tersebut dapat diambil kesimpulan sementara bahwa populasi Batak yang tinggal di Surabaya mempunyai ukuran basa DNA lokus HUMTH01 antara 195 sampai 199 *basepairs*. Peneliti menyadari bahwa untuk menyimpulkan ukuran basa DNA memerlukan sampel yang sangat besar dan perlu dilakukan sekuensing hasil PCR untuk mengetahui nukleotidanya. Namun karena keterbatasan waktu dan mengingat belum adanya data lokus STR lain sebagai pembanding untuk populasi di Indonesia, maka penelitian ini dianggap cukup mewakili.

Hasil penelitian lokus HUMTH01 ini ternyata berbeda dengan penelitian-penelitian yang dilakukan di Thailand oleh Sueblinvong dkk, 1999, penelitian di Taiwan oleh Pu dkk, 1999 dan di Portugis oleh Corte-Real, 1999 dimana alel 9 adalah yang paling sering muncul, sementara untuk populasi Batak di Surabaya alel 10 (38,1 %) yang paling sering muncul (tabel 4). Perbedaan hasil ini kemungkinan disebabkan karena dalam penelitian ini digunakan marker K562 sebagai kontrol alel. Marker K562 adalah sama dengan alel 9.3;9.3 dari lokus HUMTH01. Marker ini selain berfungsi sebagai kontrol alel juga sebagai kontrol positif untuk mengetahui

apakah PCR terkontaminasi atau tidak. Menurut Sueblinvong, 1999 alel 9.3 mempunyai ukuran 1 bp lebih pendek dari alel 10, senada dengan Foreman dkk, 1998 yang menyatakan alel 10 lebih dikenal sebagai alel 9.3 sedangkan perbedaan ukuran setiap alel lokus ini adalah 4 bp. Dalam penelitian ini alel yang terletak sama dengan marker K562 dinyatakan sebagai alel 9 dan yang berada di atasnya dan mendekati *ladder* 200 bp dinyatakan sebagai alel 10. Penentuan alel 5 sampai 11 mengacu pada *marker* CTT multiplex.

Tabel 4. Perbandingan variasi alel yang mucul, alel yang tidak muncul dan alel yang paling sering muncul pada populasi Thailand di Thailand, populasi Thailand di Taiwan, populasi Taiwan, populasi Philippine di Taiwan, populasi Portugis dan populasi Batak yang tinggal di Surabaya

Populasi	Variasi alel yang muncul	Alel tidak muncul	Alel yang tersering
Thailand di Thailand	6; 7; 8; 9; 9,3; 10	5 dan 11	9
Thailand di Taiwan	5; 6; 7; 8; 9; 9,3; 10	11	9
Taiwan	5; 6; 7; 8; 9; 9,3; 10; 11	-	9
Philippine di Taiwan	6; 7; 8; 9; 9,3; 9; 10; 11	5	9
Portugis	6; 7; 8; 9; 9,3; 10	5 dan 11	9,3
Batak di Surabaya	7; 8; 9; 10; 11	5 dan 6	10

Pada penelitian ini alel 11 cukup sering muncul sebesar 19,05 %, berbeda dengan penelitian Sueblinvong dkk, 1999 pada populasi Thailand dan penelitian Corte-Real, 1999 pada populasi Portugis (tabel 4). Hal ini kemungkinan disebabkan karena ras Indonesia merupakan percampuran antara ras Caucasoid dari India, Iran, Arab dan Belanda, dan ras Mongoloid dari Cina dan Jepang dengan sedikit percampuran ras Negrid dari Afrika barat (Jacob, 1990). Hal ini berbeda dengan populasi Thailand yang menetap di Thailand alel 11 dan 5 tidak ada tetapi pada

populasi Tailand yang menetap di Taiwan alel 5 muncul. Demikian juga populasi Portugis merupakan ras yang berbeda dengan ras Indonesia.

Persamaan penelitian ini dengan penelitian Sueblinvong dkk, 1999 pada populasi Thailand, penelitian Pu dkk, 1999 pada populasi Philippine yang tinggal di Taiwan dan penelitian Corte-Real, 1999 pada populasi Portugis adalah bahwa alel 5 tidak muncul (tabel 4). Alel 5 ini muncul pada populasi Taiwan. Tidak munculnya alel 5 dan 6 dalam penelitian ini kemungkinan karena jumlah sampel yang hanya 42, kemungkinan jika jumlah sampel semakin besar alel ini akan muncul, namun jika dengan jumlah sampel yang besarpun kedua alel ini tidak muncul berarti bahwa untuk populasi Batak alel ini tidak ditemukan.

Pada penelitian ini pasangan alel *homozygote* lebih dominan yaitu sebesar 52,38%, dan pasangan alel 9,9 lokus HUMTH01 mempunyai frekuensi terbesar yaitu 23,81 % dibandingkan dengan pasangan alel lainnya.

Dalam penelitian ini digunakan *polyacrilamide agarose composite gel* karena penambahan *composite* ternyata memberikan hasil yang lebih baik daripada gel dari *acrylamide* atau *agarose* saja. Gel agarose tidak praktis dalam persiapannya, tidak stabil bahkan kadang-kadang bervariasi. Indrayana NS (1999) yang pertama menggunakan system *polyacrilamide agarose composite gel* dengan ketebalan 1,5 mm yang dibentuk dalam *plastic minicassette* untuk menganalisa STR dan VNTR dan memberikan hasil yang baik dalam *electrophoresis* hanya dalam 1 jam. Kelebihan bahan ini adalah kuat, dapat dikeringkan dan awet sehingga dapat digunakan sebagai barang bukti otentik dalam persidangan (Kusuma, 2002).

BAB 7. PENUTUP

7.1. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini ternyata bahwa pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya alel lokus HUMTH01 yang muncul hanya 5 dari 7 alel lokus HUMTH01, yaitu alel 7, alel 8, alel 9, alel 10 dan alel 11, yang mempunyai ukuran basa DNA antara 187 sampai 203 bp. Yang paling sering muncul adalah alel 10 sebesar 38,1 %. Hal ini berbeda dengan penelitian-penelitian lokus HUMTH01 pada populasi lain di luar negeri dimana alel yang paling sering muncul adalah alel 9. Pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya yang terbanyak adalah pasangan alel *homozygote* sebesar 52,38%.

Metode pengambilan sampel dengan hapusan mukosa bukal ternyata sangat baik, murah, tidak menimbulkan rasa sakit, efektif dan akurat untuk penelitian lokus *Short Tandem Repeat*.

Polyacrylamide agarose composite gel mempunyai kelebihan dibanding gel lain karena bahan ini kuat, dapat dikeringkan dan awet sehingga dapat digunakan sebagai barang bukti otentik dalam persidangan.

7.2. SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini maka perlu dilakukan penelitian pada alel 5 dan 6 yang tidak muncul pada lokus HUMTH01 dengan cara menambah jumlah sampel penelitian. Demikian juga perlu dilakukan penelitian untuk lokus STR lainnya dan pada populasi yang lain sebagai pembanding yang nantinya akan menambah data lokus STR di Indonesia guna kepentingan identifikasi forensik terutama untuk identifikasi bahan yang jumlahnya sedikit dan tidak dapat dilakukan identifikasi dengan metode lainnya.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

DAFTAR PUSTAKA

Connor M, Ferguson-Smith M, 1997, *Essential Medical Genetics*, ed. 5, Blackwell Science, Inc, UK, pp. 9-27

Corte-Real F, Santo L, Anjos MJ, Carvalho M, Viena DN, Carracedo A, Vide MC, 1999, `Population distribution of six PCR-amplified loci in Madeira archipelago (Portugal)`, *Forensic Science International,* vol. 100, pp. 93-99

'Disaster Victim Identification Guide",version-2, 2002, INTERPOL

Foreman LA, Lambert JA, Evett IW, 1998, `Regional genetic in Caucasians`, *Forensic Science International*, vol. 95, pp. 27-37

Herniyati, 1999, Bentuk tembilang insisivus pertama permanent dan tonjol carabelli molar pertama rahang atas pada populasi Jawa, Cina di Jember dan populasi Tengger di Probolinggo, Tesis, Universitas Airlangga, Surabaya

Huskey RJ, 1996, `Hardy Weinberg equation of population genetics assumptions`, Retrieved: 12-12- 2004 from: *http://www.people.virginia.edu/~rjh9u/hwequa.html*

Indrayana, 2000, Isolasi DNA tulang dan gigi, Makalah Lokakarya Metodologi Lab Biologi Molekuler, Universitas Airlangga, Surabaya

Jacob T, 1990, Rasiologi dan rasisme pada abad XX, Pidato Dies Natalis ke 41 Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

Kusuma SE, 2002, 'Frequency distribution of D17S5 alleles in the population around Surabaya, East Java, Indonesia', *Folia Medica Indonesiana*, No.3, pp.155-159

Kusuma SE, 2002, 'Polyacrilamide agarose composite gel based system for separation of Short Tandem Repeat and Variable Number of Tandem Repeat loci to identify a Korean Woman in Bali bomb accident', *Folia Medica Indonesiana,* No.4, pp. 253-257

Kusuma SE, 2003, 'Population on the locus D16S83 of VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) polymorphism in the population around Surabaya, East Java, Inodnesia', *Folia Medica Indonesiana*, No. 1, pp. 3-9

Kusuma SE, 2004, Perkembangan mutakhir deteksi paternitas dengan teknologi DNA, Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Universitas Airlangga, Surabaya

Ladd C, Bourke MT, Scherczinger CA, Pagliao EM, Gaensslen, Lee HA, 1996, `A PCR-Based strategy for ABO genotype determination`, *Journal of Forensic Science*, vol. 41(1), pp. 134-147

Mieke, SMAR, 2000, `Chepalometric study of Manggarai population in Flores island`, *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia,* vol. 7, hal. 760-765

Pu CE, Hsieh CM, Chen MY, Wu FC, Sun CF, 1999, `Genetic variation at nine STR loci in populations from the Philippines and Thailand living in Taiwan`, *Forensic Science International,* vol. 106, pp. 1-6

Purba OHS, Purba EF, 1997, Migrasi spontan Batak Toba (marserak) sebab, motip dan akibat perpindahan penduduk dari dataran tinggi Toba, Penerbit Monora, Medan, hal. 1-16,139

Rankin DR, Narveson SD, Birkby WH, Lai J, 1996, 'Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis on DNA from Human Compact Bone', *Journal of Forensic Sciences,* vol. 41, pp. 40-46

Roy R, Steffens DL, Gartside B, Jang GY, Brumbaugh JA, 1996, `Producing STR lokus pattern from bloodstains and other forensic amples using an infrared fluorescent automated DNA sequencer`, *Journal of Forensic Sciences,* vol.41, pp.418-424

Schneider PM, Meuser S, Waiyawuth W, Seo Y, Rittner C, 1998, `Tandem repeat structure of the duplicated Y-chromosomal STR locus DYS385 and frequency studies in the German and three Asian populations`, *Forensic Science International*, vol 97, pp. 61-70

Setijanto RD, Damayanti NA, 2002, 'Metodologi penelitian ilmu kedokteran gigi', Kursus Penyegar Proses Belajar Mengajar dan Penelitian, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Mahasaraswati, Denpasar, p.32

Sopher IM, 1976, Forensic Dentistry, Charles C Thomas Publisher, Illinois, USA

Sueblinvong T, Kongsrisook U, 1999, `Population data of 8 short tandem repeat loci in the Thai population`, *Forensic Science International*, vol 103, pp. 199-205

Van Ooeschot RAH, Gutowski SJ, Robinson SL, Hedley JA, Andrew IR, 1996, `HUMTH01 validation studies : effect of substrate, environment, and mixtures`, *Journal of Forensic Sciences*, vol. 41, pp. 142-145

Vergouwen JC, 1986, Masyarakat dan hukum adat Batak Toba, Pustaka Azet, Jakarta, edisi 1, hal. 23-27

Waiyawuth W, Zhang , Rittner C, Schneider PM, 1998, `Genetic analysis of the short tandem repeat system D12S391 in the German and three Asian populations`, *Forensic Science International*, vol. 94, pp. 25-31

Yamamoto K, 1996, `Molecular biological studies on teeth, and inquest`, *Forensic Science International*, vol 80, pp. 79-87

Zainuddin M, 2000,'Metodologi Penelitian', Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya

Lampiran 1

PANITIA KELAIKAN ETIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

Nomor : 31/KKEPK. FKG/VII/2005

Komisi Kelaikan Etik Penelitian Kesehatan (KKEPK) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, telah mengkaji secara seksama rancangan penelitian yang diusulkan, maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian berjudul :

"IDENTIFIKASI POLA POLIMORFISME DNA LOKUS HUMTHO1 PADA POPULASI BATAK DI SURABAYA "

Peneliti Utama : MASNIARI NOVITA,drg

Unit / Lembaga/ Tempat Penelitian : TDC Universitas Airlangga

MENYATAKAN LAIK ETIK

Surabaya, [illegible]

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

Lampiran 2

KUESIONER

Nomer :

Nama responden :

Alamat :

Tempat/tgl lahir :

Jenis kelamin :

Di Surabaya sejak :

Status perkawinan : Menikah / Belum Menikah

Pendidikan terakhir :

Nama ayah / suku : tinggal di :

Nama ibu / suku : tinggal di :

Nama kakek dari ibu : tinggal di :

Nama kakek dari ayah: tinggal di :

Nama nenek dari ibu : tinggal di :

Nama nenek dari ayah: tinggal di :

Kondisi kesehatan : Baik / Sakit ..... Pada .....

Penyakit sistemik : Ada / Tidak Ada

Kondisi rongga mulut: Baik / Sedang / lain-lain .....

Lampiran 3

PERNYATAAN PERSETUJUAN

Yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama :

Tempat/tanggal lahir :

Umur :

Jenis kelamin : L / P

Bersedia menjadi subyek penelitian untuk pengambilan sampel dari penelitian berjudul : POLA POLIMORFISME DNA LOKUS HUMTH01 PADA POPULASI BATAK DI SURABAYA. Manfaat penelitian untuk memperoleh informasi tentang pola polimorfisme DNA lokus HUMTH01 pada populasi Batak yang tinggal di Surabaya yang nantinya berguna untuk perkembangan studi populasi di Indonesia.

Sebagai penutup : saya telah membaca/dibacakan penjelasan tersebut di atas dan saya telah diberi kesempatan untuk menanyakan hal-hal yang belum jelas dan telah diberi jawaban yang memuaskan.

Dengan ini saya menyatakan secara sukarela untuk ikut sebagai subyek di dalam penelitian ini dan saya mengerti bahwa saya berhak untuk mengundurkan diri setiap saat.

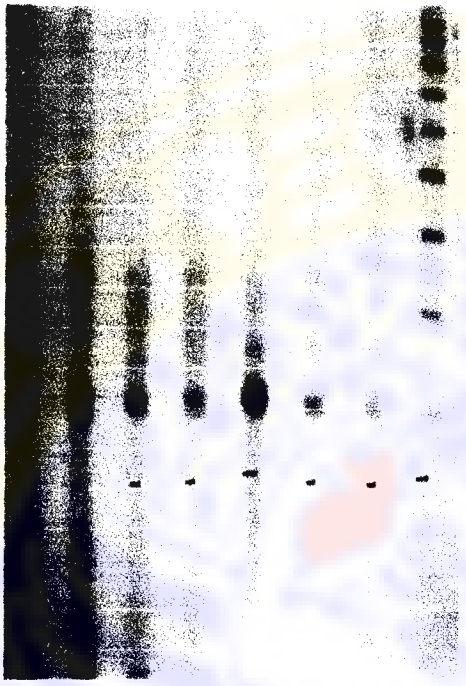
Surabaya, 2005

Ketua peneliti, Subyek penelitian,

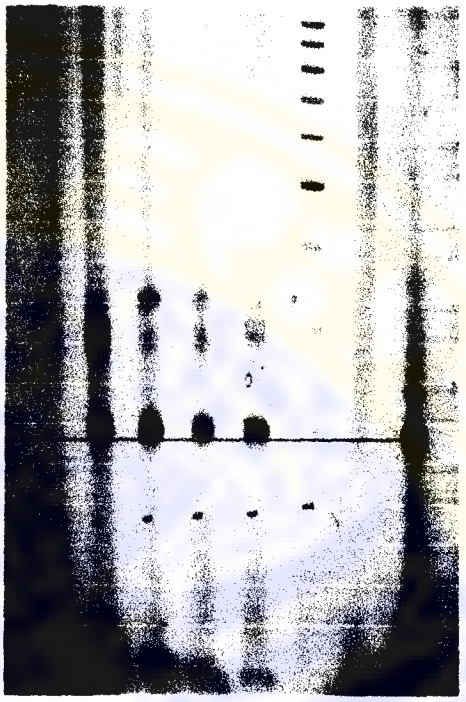
(Masniari Novita,drg) ( )

Lampiran 4

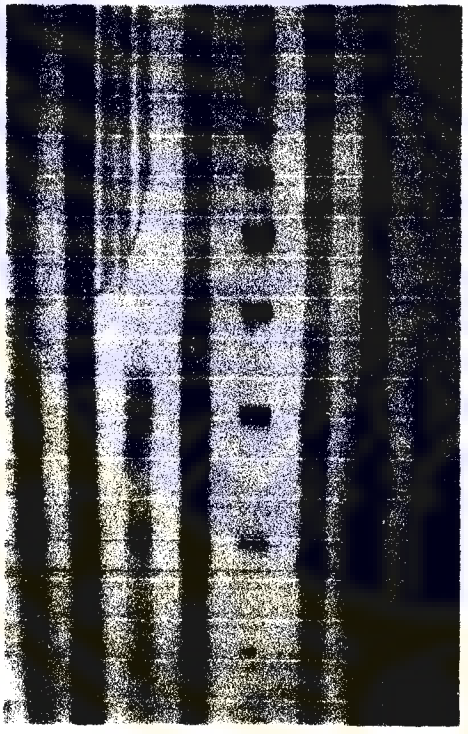
SAMPEL 1 - 6



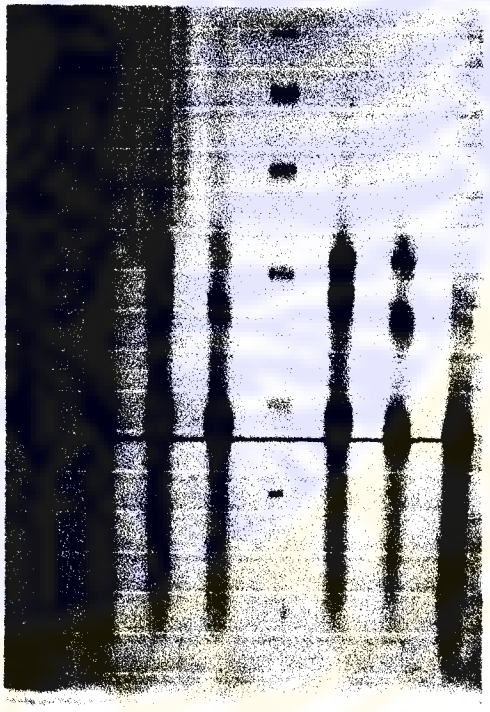
SAMPEL 7 - 12



SAMPEL 12 – 17

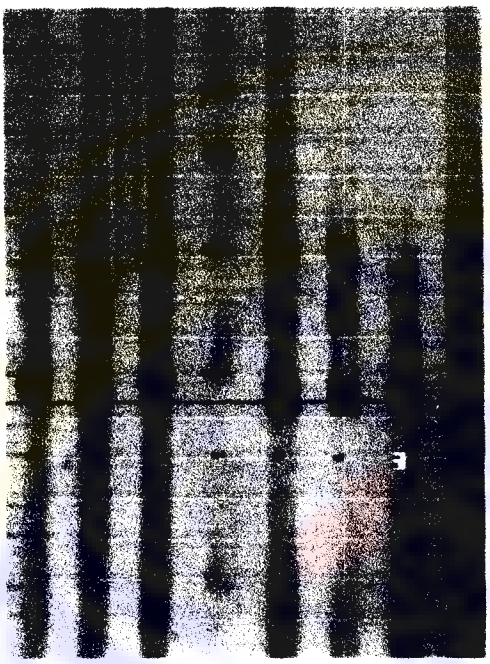


SAMPEL 18 - 23

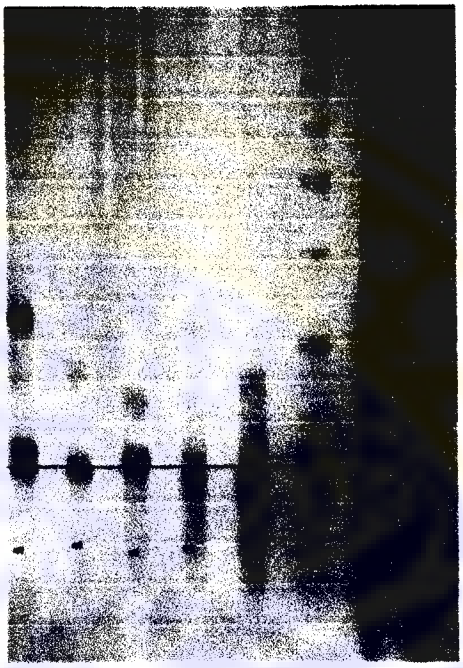


Lampiran 5

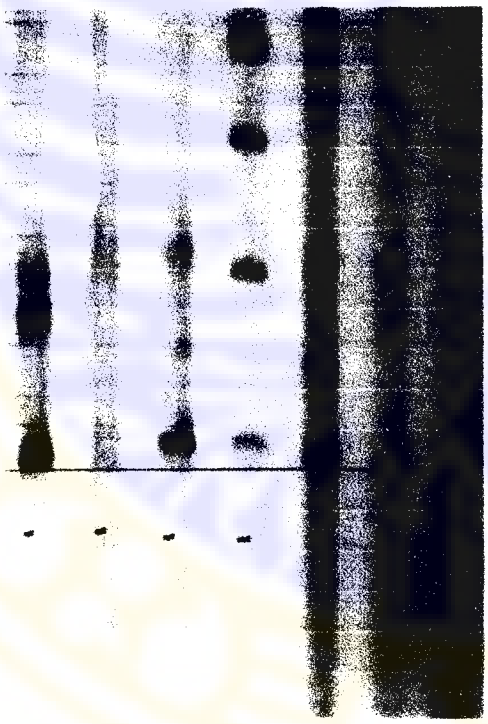
SAMPEL 24 – 29



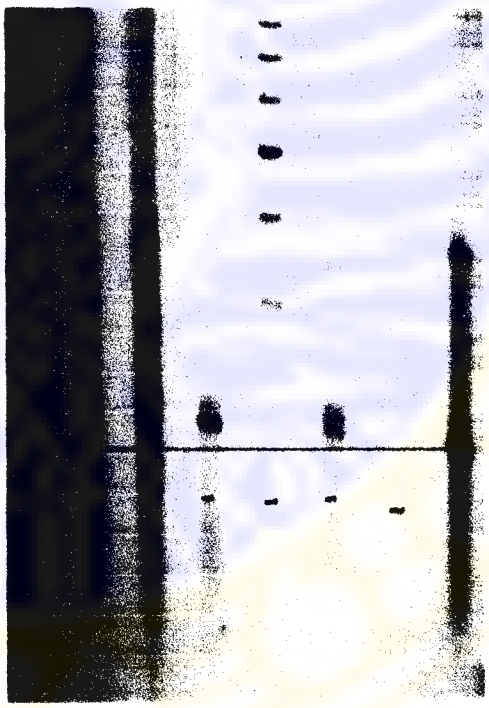
SAMPEL 29 - 34



SAMPEL 36 – 41

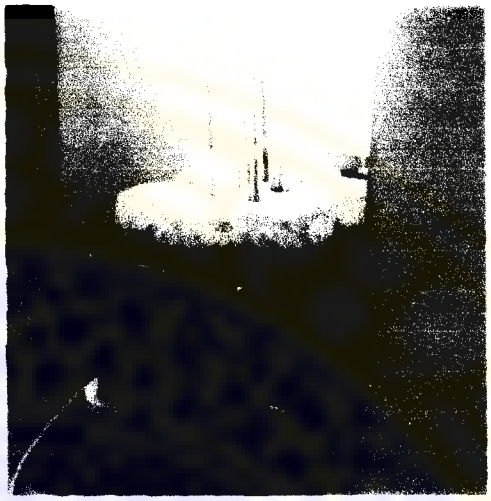


SAMPEL 42 - 45



Lampiran 6

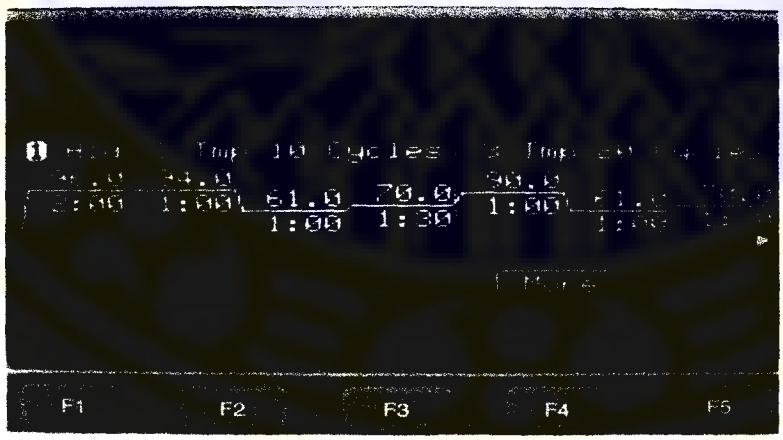
Sampel direndam dalam aquadest



Sampel digetarkan

Primer TH01 A, TH01 B dan PCR mix

Mesin PCR yang digunakan



Siklus PCR untuk lokus TH01