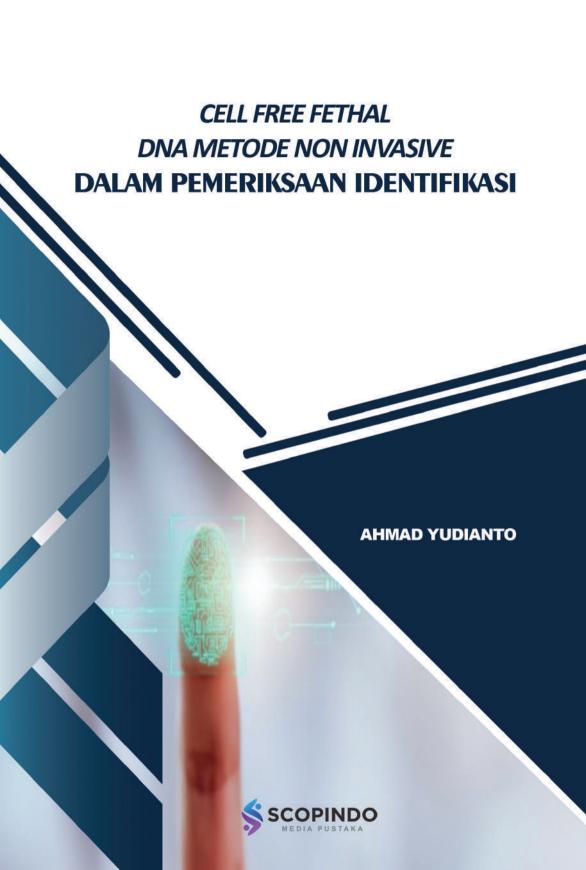
CELL FREE FETHAL DNA METODE NON INVASIVE DALAM PEMERIKSAAN IDENTIFIKASI



AHMAD YUDIANTO



CELL FREE FETHAL DNA METODE NON INVASIVE DALAM PEMERIKSAAN IDENTIFIKAS

Author:

Ahmad Yudianto

Layouter: **Dewi**

Editor:

Ahmad Yudianto

Design Cover:
Azizur Rachman

copyright © 2019 Penerbit



Scopindo Media Pustaka Jl. Kebonsari Tengah No. 03, Surabaya Telp. (031) 82519566 scopindomedia@gmail.com

ISBN: 978-623-6500-10-1

Hak cipta dilindungi oleh Undang-undang Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku tanpa izin tertulis dari Penerbit

Sanksi Pelanggaran Pasal 113

Undang-undang Nomor 28 Tahun 2014 Tentang Hak Cipta

Setiap orang yang dengan atau tanpa hak melakukan pelanggaran terhadap hak ekonomi yang sebagaimana dimaksud dalam pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan ancaman pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 100.000.000 (seratus juta rupiah)

Setiap orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 500.000.000 (lima ratus juta rupiah).

Setiap orang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau Pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk peggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 1.000.000.000 (satu miliar rupiah).



Alhamdulillah, puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan inayah-Nya sehingga penyusunan Buku "Cell Free Fethal DNA Metode Non Invasive Dalam Pemeriksaan Identifikasi" dapat diselesaikan. Terbitnya Buku ini sebagai salah satu produk dalam luaran penelitian penulis.

Buku ini pada dasarnya merupakan kumpulan materi-materi mengenai fenomena pemeriksaan identifikasi dalam tes paternitas, DNA, identifikasi forensik dengan analisis DNA, STRs-CODIS, metode amplifikasi DNA dengan PCR, definisi cff-DNA, mekanisme cff-DNA/DNA fetus Sirkulasi Maternal, Sel Berinti Fetus dalam sirkulasi maternal, cell-free fetal mRNA/cff-mRNA/mRNA Fetus Dalam Sirkulasi Maternal

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membagi sebagian pengetahuannya sehingga penulis dapat menyelesaikan buku ini.

Penulis menyadari, buku ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun akan penulis nantikan demi kesempurnaan buku ini.

Surabaya, 17 Juni 2019

Penulis





DAFTAR ISI

HA	ALAMAN JUDUL	i
	AKATA	
	FTAR ISI	
BA	B I FENOMENA PEMERIKSAAN IDENTIFIKASI	
DA	LAM TES PATERNITAS	1
		_
	B II DEOXYRIBONUCLEID ACID (DNA)	
A.	0	8
В.	1 S	4.0
	(STRs-CODIS)	
C.	Metode Amplifikasi DNA dengan PCR	17
BA	B III CELL FREE FETHAL DNA (cff-DNA)	21
Α.		
В.	Mekanisme cff-DNA/DNA Fetus Sirkulasi Maternal	
C.	Sel Berinti Fetus (Fetal Nucleated Cells) Dalam Sirkulasi	
	Maternal	26
D.	Cell Free Fethal mRNA/cff-mRNA/mRNA Fetus Dalam	= 0
	Sirkulasi Maternal	26
	B IV CELL FREE FETHAL DNA METODE NON	
IN	VASIVE DALAM PEMERIKSAAN IDENTIFIKASI	29
RΔ	B V PENUTUP	13
В А.	Kesimpulan	
л. В.	Saran	
D.	Saraii	44
D A	FTAR PIISTAKA	45







Perkawinan merupakan sesuatu yang sakral dan agung dalam roda kehidupan. Sehingga momentum ini oleh sebagian besar manusia di dunia melalui suatu tahapan yang panjang menyesuaikan adat istiadat serta norma hokum yang berlaku. Di Indonesia perkawinan semua harus tercatat dalam akta perkawinan. Ketentuan yang mengatur segala hal terkait perkawinan tersebut diatur dalam Undang-undang Republik Indonesia Nomor 1 / Tahun 1974 tentang perkawinan [Lembaran Negara No 55 / 1974].

Akhir-akhir ini marak di bicarakan tentang kasus pembunuhan atau perselisihan rumah tangga,yang dibicarakan adalah tentang status dari si korban pembunuhan atau identikasi dari korban serta identikasi dari seorang anak yang diragukan statusnya dengan melalui tes atau pemeriksaan *Deoksiribo nucleid acid* [DNA]. Setiap orang memiliki DNA yang unik. DNA adalah materi genetik yang membawa informasi yang dapat diturunkan. Di dalam sel manusia DNA dapat ditemukan di dalam inti sel dan di dalam mitokondria. Di dalam inti sel, DNA membentuk satu kesatuan untaian yang disebut kromosom. Setiap sel manusia yang normal memiliki 46 kromosom yang terdiri dari 22 pasang kromosom somatik dan 1 pasang kromosom sex (XX atau XY).

Setiap anak akan menerima setengah pasang kromosom dari ayah dan setengah pasang kromosom lainnya dari ibu sehingga setiap individu membawa sifat yang diturunkan baik dari ibu maupun ayah. Sedangkan DNA yang berada pada mitokondria hanya diturunkan dari ibu kepada anak-anaknya. Keunikan pola pewarisan DNA mitokondria menyebabkan DNA mitokondria dapat digunakan sebagai marka untuk mengidentifikasi hubungan kekerabatan secara maternal. Kedua pola penurunan materi genetik dapat diilustrasi seperti gambar sebelumnya. Dengan perkembangan teknologi, pemeriksaan DNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan membedakan individu yang satu dengan individu yang lain.

Ketika seseorang dengan alasan yang sangat beragam dan pribadi ingin tahu akan identitasnya, maka salah satu cara yang dapat dilakukan untuk menyelesaikan masalah tersebut adalah identifikasi DNA (Deoxyribo Nucleic Acid). Identifikasi DNA dapat dimanfaatkan untuk

mengetahui hubungan biologis antar individu dalam sebuah keluarga dengan cara membandingkan pola DNA individu-individu tersebut

Pada tahun 2012 mahkamah konstitusi telah memutuskan Judiciel Review pasal 43 ayat 1 UU RI No 1 / 1974 tentang perkawinan, yakni Anak yang dilahirkan di luar perkawinan mempunyai hubungan perdata dengan ibunya dan keluarga ibunya serta dengan laki-laki sebagai ayahnya yang dapat dibuktikan berdasarkan ilmu pengetahuan dan teknologi dan/atau alat bukti lain menurut hukum mempunyai hubungan darah, termasuk hubungan perdata dengan keluarga ayahnya.

Salah satu pembuktian yang dimaksud pasal 43 [1] UU RI No 1/1974 tersebut yakni identifikasi forensic melalui analisis DNA. Identifikasi analisis DNA tersebut dapat dimanfaatkan untuk mengetahui hubungan biologis antar individu dalam sebuah keluarga dengan cara membandingkan pola DNA individu-individu tersebut (Yudianto, 2015). Secara ilmiah tidaklah mungkin seorang perempuan hamil tanpa terjadinya pertemuan antara ovum dengan spermatozoa baik melalui hubungan seksual (coitus) maupun melalui cara lain berdasarkan perkembangan teknologi yang menyebabkan terjadinya pembuahan. Oleh karena itu tidak tepat dan tidak adil manakala hukum menetapkan bahwa anak yang lahir dari suatu kehamilan karena hubungan seksual diluar perkawinan hanya memiliki hubungan dengan perempuan tersebut sebagai ibunya. Adalah tidak tepat dan tidak adil pula jika hukum membebaskan laki-laki yang melakukan hubungan seksual yang menyebabkan terjadinya kehamilan dan kelahiran anak tersebut dari tanggung jawabnya sebagai seorang bapak dan bersamaan dengan itu hukum meniadakan hak-hak anak terhadap lelaki tersebut sebagai bapaknya [Syahuri T, 2013]

Identifikasi forensik dengan pemeriksaan DNA yang selama ini digunakan untuk menentukan asal usul anak; kasus paternitas; hubungan kekeluargaan, maupun identifikasi korban tak dikenal, semakin hari semakin diakui keberadaannya dalam menunjang penegakan hukum di tanah air. Hal ini terbukti dengan pengakuan terhadap pemeriksaan yang ditemukan oleh Sir Alec Jeffrey ini sebagai alat bukti di pengadilan negeri maupun pengadilan agama sejak tahun 1997 (Atmaja, 2005).



Tes paternitas merupakan pemeriksaan DNA untuk menentukan apakah seorang pria adalah ayah biologis dari seorang anak. Semua manusia mewarisi DNA (materi genetik) dari orang tua biologis kita. Tes paternitas membandingkan pola DNA anak dengan terduga ayah untuk memeriksa bukti pewarisan DNA yang menunjukkan kepastian adanya hubungan biologis (Yudianto, 2015).

Tes paternitas atau pemeriksaan DNA atau tes DNA dilakukan dengan mengambil sedikit bagian dari seseorang untuk dibandingkan dengan orang lain. Bagian yang dapat sering diambil untuk dicek adalah rambut, air liur, urine, cairan vagina, sperma, darah, dan jaringan tubuh lainnya. Pemeriksaan DNA memiliki kekuatan hukum karena dilakukan oleh para ahli dan mencerminkan kepastian hukum karena sampel yang diperoleh melalui pemeriksaan DNA ini tidak akan berubah sepanjang hidup seseorang.

Identifikasi DNA untuk tes paternitas dilakukan dengan menganalisa pola DNA menggunakan marka STR (*short tandem repeat*). STR adalah lokus DNA yang tersusun atas pengulangan 2-6 basa. Dalam genom manusia dapat ditemukan pengulangan basa yang bervariasi jumlah dan jenisnya. Identifikasi DNA dengan penanda STR merupakan salah satu prosedur tes DNA yang sangat sensitif karena penanda STR memiliki tingkat variasi yang tinggi baik antar lokus STR maupun antar individu (Butler, 2013).

Data di laboratorium *Human genetic* (ITD) *Institute Disease Center* Kampus C Universitas Airlangga menunjukkan jumlah pasien yang melakukan tes paternitas trend meningkat sejak tahun 2010, dimana jumlah pasien yang melakukan pemeriksaan 30 pasien dalam kurun waktu 2010-2016 (Data Lab. HG.ITD). Tes DNA adalah 100% akurat bila dikerjakan dengan benar. Tes DNA ini memberikan hasil lebih dari 99.99% probabilitas paternitas bila DNA terduga ayah dan DNA anak cocok (*matched*). Apabila DNA terduga ayah dan anak tidak cocok (*mismatched*) maka terduga ayah yang di tes 100% bukanlah merupakan ayah biologis anak tersebut. Konfirmasi dilakukan dengan mengulang tes terhadap terduga ayah.

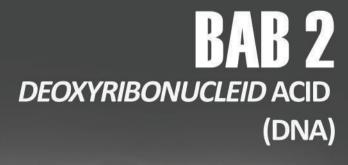


Tes paternitas dapat dilakukan sebelum anak dilahirkan (prenatal). Tes DNA dapat dilakukan dengan sampel dari jaringan janin (Chorionic Villi Sample, CVS) umumnya pada umur kehamilan 10-13 minggu, atau dengan cara amniosentesis pada umur kehamilan 14-24 minggu. Untuk pengambilan jaringan janin ini harus dilakukan oleh ahli kebidanan/kandungan. Ibu yang ingin melakukan tes DNA prenatal harus berkonsultasi dengan ahli kebidanan/kandungan.

Di awal tahun 1990an, Lo et al., (1996) untuk mengajukan teori bahwa secara alamiah, dalam tubuh maternal yang sedang hamil senantiasa terjadi lalu lintas molekul dan bahkan sel dari fetus menuju maternal maupun sebaliknya, dari maternal menuju fetus. Selanjutnya, penelitian di bidang bidirectional traffic relatif terus berkembang dan salah satu topik yang berkembang dengan sangat pesat adalah tentang cell-free fetal DNA (cff-DNA) atau fethal free DNA. Selama ini, minimnya konsentrasi cff-DNA di dalam plasma maternal seringkali membuat hasil yang didapatkan melalui diagnosis prenatal berbasis cff-DNA bernilai false positive atau justru sebaliknya, yaitu false negative. Sejauh ini penggunaan fetal free DNA (cff-DNA).dalam darah ibu hamil sebagai teknik unimvasive dalam penentuan keayahan [tes paternitas] belum banyak di buktikan.









- A. Identifikasi Forensik dengan Analisa DNA
- B. Short Tandem Repeats -Combined Index DNA System (STRs-CODIS)
- C. Metode Amplifikasi DNA dengan PCR

A. Identifikasi Forensik dengan Analisis DNA

Pemeriksaan sidik jari DNA (*DNA Fingerprinting*) pertama kali diperkenalkan oleh Sir Alex Jefreys pada tahun 1985. Pemeriksaan ini lebih unggul dan akurat dibandingkan dengan cara konvensional seperti halnya pemeriksaan serologi forensik, maka identifikasi memasuki suatu era baru, yang sebagian kalangan kedokteran forensik menyebutnya sebagai revolusi ilmu kedokteran forensik. Penemuan ini telah membawa perkembangan teknologi DNA di bidang kedokteran forensik ke arah kemajuan yang menggembirakan sehingga identifikasi korban di bidang forensik bukan merupakan sebuah masalah yang begitu besar (Notosoehardjo, 2003; Kusuma, 2004).

Identifikasi melalui pemeriksaan analisis DNA, pada korban atau barang bukti yang sulit dikenali tidak lagi berdasarkan ciri-ciri fisik melainkan pada daerah (lokus) DNA korban atau barang bukti tersebut. Pemeriksaan ini didasarkan bahwa DNA manusia ternyata bersifat individual dan spesifik, karena susunan DNA manusia adalah khas untuk setiap individu maka DNA dapat untuk digunakan membedakan individu satu dengan lainnya (Notosoehardjo, 2003).

DNA merupakan polinukleotida. Monomernya adalah nukleotida. Setiap nukleotida tersusun oleh tiga komponen, yaitu molekul gula pentosa (deoxyribose), gugus phosphat dan basa nitrogen. Dua komponen pertama terdapat disemua nukleotida dengan susunan dan bentuk yang identik, sedangkan komponen ketiga (basa nitrogen) mempunyai susunan dan bentuk yang berbeda didalam satu nukleotida dengan nukleotida lainnya. Basa nitrogen utama DNA adalah Guanin dan Adenin yang merupakan purin serta Sitosin dan Timin yang merupakan pirimidin.

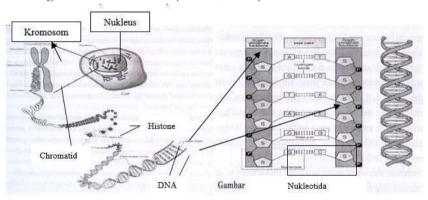
Urutan basa nitrogen yang membentuk DNA ini yang dapat membedakan antara individu satu dengan individu lainnya, karena urutan atau susunan basa-basa tersebut berbeda antara satu orang dengan orang lainnya (Notosoehardjo,2001; Murrai et al, 1996; Suryohudoyo, 1995).

Nukleotida saling berikatan melalui ikatan fosfodiesterase 5'-3' (tanda' digunakan pada pemberian nomor unsur karbon pada ribose untuk membedakan dari pemberian nomor unsur-unsur pada basa N), antara



fosfat pada C₅ dari suatu nukleotida dengan C₃ dari nukleotida lain1. Dengan aturan ini, maka pada ujung-ujung rantai polinukleotida akan ditemukan fosfat pada ujung 5' dan radikal OH pada ujung 3'. Basa Adenin (A) selalu berikatan dengan Thymin (T) dari nukleotida lain, sedangkan basa Guanin (G) dengan basa Cytosin (C) nukleotida lain. Adenin dan timin berikatan dengan dua ikatan hidrogen, sedangkan guanin dan cytosin berikatan dengan tiga ikatan hidrogen hingga lebih stabil. Dengan demikian, ikatan G-C lebih kuat sekitar 50%, karena tambahan kekuatan ini dan juga karena interaksi yang saling bersusun, maka daerah-daerah DNA yang kaya akan ikatan G-C jauh lebih resisten terhadap proses denaturasi (proses pemisahan) daripada daerah-daerah yang kaya akan A dan T.

Panjang keseluruhan DNA dalam kromosom *haploid* adalah 3000 *Megabasepair* (3 X 10⁹ *basepair*) dengan jarak antara *basepair* dalam DNA helix adalah 0,34 nm (3,4A), sehingga panjang *haploid* DNA jika direntangkan sekitar 1 meter (Cannor, 1997).



Gambar. 2.1. Struktur DNA [Butler, 2005]

Bahan DNA pada jaringan tubuh manusia sebagian besar dijumpai pada nukleus atau inti sel. Oleh sebab itu DNA tersebut disebut dengan *nuclear DNA (nuDNA)* atau DNA inti atau *core*-DNA(c-DNA). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa c-DNA manusia tersebar didalam 23 pasang kromosom. c-DNA sel anak merupakan gabungan c-DNA sel



ovum (dari ibu) dan c-DNA spermatozoa (dari bapak). Hal ini berakibat, c-DNA anak selalu merupakan kombinasi dari c-DNA ibu dan bapaknya penurunan bersifat parental, suatu pola penurunan yang kita kenal sebagai hukum Mendel.

Sebagian besar DNA yang terletak dalam nukleus (*cDNA*) membentuk kromosom, namun juga terdapat DNA ekstrakromosom yang jumlahnya sangat kecil didalam mitochondria (*mtDNA*), DNA yang terdapat di nukleus tersebut berkelompok menurut sifatnya masingmasing, pada bagian persilangan dari keempat kaki kromosom (*sentromer*) berkumpul DNA yang bersifat *chromosome-spesicific* dan *species-specific* sedang pada keempat ujung kaki-kaki kromosom (*telomer*) berkumpul DNA yang besifat *individual specific* (Atmaja, 2005).

Pada genom manusia diketahui mengandung banyak sekali urutan DNA berulang, yang bervariasi dalam ukuran maupun panjangnya (Sudoyo, 2003). Bagian DNA ini tersebar dalam seluruh genom manusia sehingga merupakan multilokus dan dimiliki oleh semua orang tetapi masing-masing individu mempunyai jumlah pengulangan yang berbedabeda satu sama lain, maka kemungkinan dua individu mempunyai fragmen DNA yang sama adalah sangat kecil sekali (Kirby, 1990). Selain itu *repetitive* DNA mempunyai sifat: setiap individu tetap dan diturunkan dari orang tua dan bisa ditemukan disekeliling *sentromer* kromosomal.

Tandem repetitive DNA dibagi menjadi microsatellit, minisatellit dan macrosatellit repeat. Microsatellit repeat bila kurang dari 1 kb(kilohasepair) dan repeat motif yang sering muncul adalah A, AC, AAAN (dimana N bisa nukleotida apa saja), AAN dan AG, yang biasanya disebut dengan 'Short Tandem Repeat (STR)'. Minisatellite biasanya 1-30 kb (kilohasepair) panjangnya dengan mempunyai repeat motif lebih panjang daripada microsatellit repeat dan sering disebut 'Long Tandem Repeat (LTR)'. Sedangkan macrosatellit repeat mempunyai panjang sampai megabase yang ditemukan diujung lengan kromosom (telomere) dan sentromere (Connor, 1997).

Microsatellite repeat sering disebut dengan 'STR (Short Tandem Repeat)' merupakan daerah DNA dengan unit pengulangan (repeat motif) 3 sampai 7 bp (Stimson,1997; Rose et.al,1990; Kusuma,2004; Buttler, 2005). Jadi



dengan kata lain, STR adalah *tandem repeat* dengan *repeat motifs* yang amat pendek. Pada setiap lokus STR, setiap individu memiliki 2 fragmen DNA yang masing-masing berasal dari orang tuanya.

Variasi urutan basa dalam DNA didalam setiap sel manusia disebut sifat *polimorfisme*. *Polimorfisme* merupakan suatu istilah yang digunakan untuk menunjukkan adanya suatu bentuk yang berbeda dari struktur dasar yang sama (Atmaja, 1992). Suatu lokus baru dikatakan sebagai polimorfisme jika alel yang paling sering ditemukan frekwensinya 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; S Yudha, 2005). Sifat polimorfisme ini diduga akibat adanya pertukaran yang tidak sama (unequal exchange) pada proses mitosis dan meiosis, sehingga menunjukkan variasi setiap individu yang dapat memberikan keuntungan karena untuk membedakan satu orang dengan yang lainnya. Hal inilah dimanfaatkan dalam kedokteran forensik sebagai dasar bagi identifikasi melalui analisis DNA. Polimorfisme DNA tersebut dapat berupa perubahan urutan basa nukleotidanya dan adanya perbedaan panjang fragmen DNA hasil pemotongan dengan enzim restriksi.

Keunggulan dari analisis DNA *fingerprinting* diantaranya karena DNA memiliki kestabilan pada sel somatik yang artinya gambaran DNA dari darah, sperma, rambut, organ dan sebagainya identik, sehingga cocok untuk digunakan sebagai bahan identifikasi (Jeffrey et.al, 1985).

Analisis DNA Fingerprinting antara lain analisis melalui VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) dan RFLP (Restriction Fragmen Length Polymorphisms). VNTR analisis pemeriksaan DNA yang didasarkan pada perulangan urutan basa tertentu (core sequences), yang berulang dengan jumlah perulangan yang berbeda-beda antara seseorang dengan orang lain. Daerah (region) dengan core sequences 1 sampai 30 kb(kilohasepair) dikenal istilah 'minisatellite' atau disebut dengan long Tandem Repeat (LTR)s. Sedangkan daerah DNA dengan core sequences kurang 1 kb(kilohasepair), dikenal dengan istilah 'microsatellite' atau disebut dengan Short Tandem Repeat (STR) (Stimsom,1997). Oleh karena banyaknya jumlah alel (pengulangan)



yang ada, maka setiap alel yang sama relatif jarang ditemukan dalam populasi, sehingga *polimorfisme* ini amat informatif digunakan sebagai pembeda genetik antar individu (Rose et al,1990).

Sejak diketemukan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) oleh Kary Mullis pada tahun 1986, perkembangan biologi molekuler menjadi semakin cepat, terutama dalam dunia kedokteran forensik karena dengan metode PCR ini hanya membutuhkan jumlah DNA yang lebih sedikit. Pada jumlah DNA yang 'sedikit' tersebut, PCR mampu menggandakan DNA berlipat-lipat jumlahnya, sehingga dapat dilakukan analisis DNA. Dengan memperbanyak DNA jutaan sampai milyaran kali, yang memungkinkan dianalisisnya sampel/specimen forensik yang jumlahnya amat minim, seperti analisis kerokan kuku (cakaran korban pada pelaku), baju korban atau pelaku, bercak mani, puntung rokok dan sebagainya. Kelebihan lain dari pemeriksaan dengan PCR adalah kemampuannya untuk menganalisa bahan yang sudah terdegradasi sebagian (Kirby, 1990; Atmaja ,1997).

Dengan adanya metode PCR bagian DNA yang ingin diperbanyak dapat diamplifikasi dengan menggunakan primer yang telah diketahui urutan basanya, sehingga pemeriksaan DNA dengan menggunakan analisis STR ini dapat dilakukan secara mudah dan cepat (Notosoehardjo, 1999). PCR mampu menggandakan DNA berlipat-lipat jumlahnya untuk kemudian dilakukan analisis sidikjari DNAnya (DNA *fingerprinting*).

Lokus-lokus pada STR memiliki ukuran alel yang kecil (kurang dari 300 *basepair*), maka dengan PCR dengan mudah diamplifikasi dan pada sampel yang mengalami degradasipun dapat dianalisis (Gill, 1991)

Pada pemeriksaan dengan analisis STR, mengingat DNA merupakan sebuah rangkaian genetik yang sangat panjang, maka pemeriksaan yang dilakukan hanya pada beberapa lokus (daerah) DNA saja. Analisis STR dapat dikerjakan dalam beberapa hari, yang lebih pendek daripada analisis RLFP yang memerlukan waktu beberapa minggu. Saat ini analisis STR tersebut yang paling sering digunakan dalam pemeriksaan identifikasi forensik (Sullivan, 1992; Roy, 1996). Disamping itu juga analisis STR merupakan alat yang bagus dan efisien dalam *forensic stain typing* dari kasus kriminal dan paternitas (Waiyawuth, 1998). Dari sekitar 13 lokus yang ada



pada analisis STR ini, pada beberapa laboratorium hanya memakai paling sedikit 3 lokus (daerah) (Sosiawan dan Kusuma, 2004). Dengan hanya menggunakan 5 – 6 lokus, maka kemungkinan kesamaan DNA *polymorfisme* antar individu 1 berbanding 100 milyar (Atmaja, 2005; Nidom, 2005).

B. Short Tandem Repeats - Combined Index DNA System [STRs-CODIS]

Genom-genom *eukariotik* penuh dengan rangkaian pengulangan DNA. Unit-unit perulangan panjang bisa mengandung beberapa ratus hingga beberapa ribu dalam pengulangan inti.

Daerah-daerah DNA dengan panjang unit-unit pengulangan (core sequence) kurang dari 1 kb (kilohasepair) disebut microsatellit atau short tandem repeat (STR) atau simple sequence repeat (SSR) (Cannor,1997; Buttler et al,2003). STR menjadi penanda pengulangan DNA yang populer karena lokus-lokus STR memiliki ukuran alel yang kecil (kurang dari 1 kb dan rata-rata terbanyak 300 bp) maka dapat diamplifikasi dengan mudah dengan PCR dan sampel yang telah terdegradasipun dapat dianalisa. Hal ini berkaitan dengan kenyataan bahwa kedua alel dari individu heterozigot memiliki ukuran sama karena ukuran pengulangannya kecil. Jumlah pengulangan dalam penanda STR bisa sangat beragam diantara individu sehingga efektif untuk tujuan identifikasi manusia (Buttler et.al, 2003).

Ukuran alel STR yang kecil tersebut membuat penanda STR menjadi lebih baik untuk digunakan dalam aplikasi forensik, dimana banyak DNA yang rusak. Amplifikasi PCR dari sampel-sampel DNA yang rusak bisa diselesaikan dengan lebih baik dengan ukuran produk/penanda yang lebih kecil (Buttler et.al, 2003).

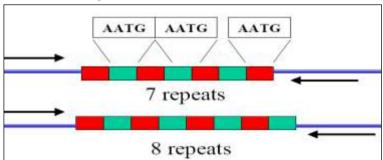
Federal Bureau Investigation (FBI) telah mendesain 13 lokus sebagai sistem identifikasi forensik nasional dengan bersinergis dengan Combined DNA Index System (CODIS) database, lokus STR tersebut meliputi TH01, TP0X, CSF1PO, vWA, FGA, D3S1358, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, D8S1179, D18S51, dan D21S11 (Butler, 2003; Kusuma, 2004). Lokus-lokus STR tersebut seperti tabel berikut ini.



Locus Name	Chromosomal Location	Repeat Motif ISFH format	GenBank Accession	Allele in GenBank	Allele Range	Number of *
C8F1PO	5q33:3-34	TAGA	X14720	12	6-16	15
FGA	4928	CTTT	M64982	21	15-51.2	69
TH01	11p15.5	TCAT	D00269	9	3-14	20
TPOX	2p23-pter	GAAT	M68651	.11	6-13	10
VWA	12p12-pter	[TCTG][TCTA]	M25858	18	10-24	28
D381358	Зр	[TCTG][TCTA]	NT_005997	18	9-20	20
D5S818	5q21-31	AGAT	G08446	11	7-16	10
D7S820	7q11.21-22	GATA	G08616	12	6-15	22
D8S1179	8	[TCTA][TCTG]	G08710	12	8-19	13
D136317	13922-31	TATC	G09017	13	5-15	14
D168539	16q24-qter	GATA	G07925	11	5-15	10
D18851	18q21,3	AGAA	L18333	13	7-27	43
D21S11	21q21	Complex [TCTA][TCTG]	AP000433	29	24-38	70
				* Butler, E	orensic DNA	Typing, Appendix

Tabel: Informasi 13 lokus CODIS (Butler, 2001)

Dari tabel diatas ditunjukkan 13 lokus STR CODIS mengenai letak atau lokasi pada kromosom, pola pengulangan nukleotidanya dari tiap lokus serta kode akses pada GenBank.



Gambar 2.2 Ilustrasi perulangan pada lokus *Short Tandem Repeat* (STR) (Butler, 2003)

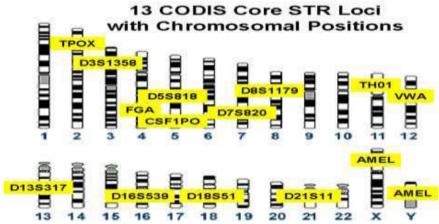
Diantara beberapa jenis penanda STR, pengulangan tetranukleotida (*core sequence* 4 bp seperti misalnya AATG pada gambar 2.2) menjadi lebih populer daripada dinukleotida atau trinukleotida, karena rentang ukuran alel yang sempit memungkinkan multifleksi (Butler 2003).

Jumlah pengulangan dalam penanda STR itu sendiri sangatlah beragam diantara individu, sehingga sangat efektif untuk digunakan



sebagai alat identifikasi manusia (Butler, 2003). Short Tandem Repeat (STR) mempunyai beberapa kelebihan jika digunakan sebagai identifikasi forensik yaitu dapat digunakan untuk DNA yang terdegradasi karena fragmen DNA yang dibutuhkan lebih pendek, jumlah yang sedikit dari sampel dapat digunakan (melalui PCR), proses analisis cepat, jumlah lokus yang potensial dianalisis jauh lebih besar dan kit analisis sudah tersedia (Butler ,2001:2003: Nidom,2005).

Tiga belas (13) lokus tersebut sebagai sistem identifikasi forensik nasional ditambah dengan marker *amelogenin* yang digunakan untuk menentukan jenis kelamin korban



Gambar 2.3 lokasi lokus DNA inti pada kromosom manusia (Butler, 2003)

Pemberian tata nama disesuaikan dengan nama gen yang ada didalamnya namun juga ada berdasarkan letak dalam kromosom, misalnya pada lokus D7S820 yang mempunyai arti D: DNA, 7 merupakan nomor kromosom (7: kromosom 7), S: single copy sequence, angka 820 menunjukkan dekripsi lokus ke 820 pada kromosom tersebut. Dari 2.3 menunjukkan lokasi dari 13 lokus STR CODIS pada tiap kromosom manusia. TPOX dan D2S1338 terletak pada kromosom 2, kromosom 3 hanya lokus D3S1358, lokus FGA pada kromosom 3, lokus CSF1PO dan D5S818 terletak pada kromosom 5. Sedangkan lokus D7S820 pada



kromosom 7, lokus D8S1179 pada kromosom 8 serta lokus THO1 pada kromosom 11 dan lokus vWA pada kromosom 12. (Butler, 2003)

European DNA Profiling Group (EDNAP) dan rekomendasi European Network of Forensic Science Institute (ENSFI), pada pertemuan kerja Interpol tahun 1997, mengemukan empat standar lokus STR yang digunakan, yakni: HUMTH01 (human THO1), HUMVWFA31, D21S11 dan HUMFIBRA/FGA, ditambah dengan lokus D3S21358, D8S1179 dan D18S51 (Kusuma, 2004). Sedang lokus VNTR yang direkomendasikan dalam pemeriksaan meliputi: D1S80, D17S5, APO-B, D16S83 dan D17S766 (Kusuma, 2004). Kedua sistem tersebut di atas (CODIS dan EDNAP), dapat digunakan untuk keperluan identifikasi DNA forensik maupun untuk keperluan pemeriksaan paternitas atau paternity testing. Hal ini mengingat kedua keperluan tersebut memiliki prinsip yang sama, yakni didasarkan pada hukum Mendel tentang pewarisan sifat pada individu yang diidentifikasi maupun yang akan ditentukan status keayahannya.

STR mempunyai beberapa kelebihan jika digunakan sebagai identifikasi forensik yaitu (Buttler et.al, 2003; Nidom, 2005) :

- Dapat digunakan untuk DNA yang terdegradasi, karena fragmen DNA yang dibutuhkan lebih pendek.
- 2. Jumlah yang sedikit dari sample dapat digunakan (melalui PCR)
- 3. Proses analisis cepat
- 4. Jumlah lokus yang potensial dianalisis jauh lebih besar
- 5. Kit analisis sudah tersedia.

Di antara beberapa jenis penanda STR, pengulangan tetranukleotida (core sequencenya 4 bp) menjadi lebih populer daripada dinukleotida atau trinukleotida, karena rentang ukuran alel yang sempit memungkinkan multifleksi.

Lokus-lokus STR dibagi empat kategori (Buttler et.al, 2003):

- 1. Pengulangan sederhana yang mengandung satu rangkaian pengulangan: TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D16S539.
- Pengulangan sederhana dengan alel non-consensus: THO1, D18S51, D7S820.



- 3. Pengulangan campuran dengan alel *non-consensus*: vWA, FGA, D3S1358, D8S1179.
- 4. Pengulangan kompleks: D21S11

C. Metode amplifikasi DNA dengan PCR

PCR atau Polymerase Chain Reaction adalah suatu metode enzimatik in vitro yang digunakan untuk menghasilkan gugus DNA yang spesifik dalam jumlah besar dan dalam waktu singkat melalui tahap *denaturation, annealing dan extension* pada temperatur yang berbeda (De Wit dkk., 1991; Wichitwechekarn dkk., 1995; Agusni, 2001).

Penggunaan teknik PCR dalam mengamplifikasi DNA target di bidang forensik, dilaporkan dalam berbagai penelitian memiliki tingkat keberhasilan yang sangat tinggi. Hal ini mengingat DNA yang dibutuhkan relatif dalam jumlah yang sangat sedikit, dengan tingkat "kesegaran" yang relatif lebih rendah dibandingkan dengan teknik RFLP atau *Restriction Fragment Length Polymorphisms*, yang selama ini digunakan dalam pemeriksaan DNA forensik (NotoSoehardjo, 1999).

Menurut NotoSoehardjo (1999), pengalaman selama ini menunjukkan bahwa sekitar 40 % dari sampel-sampel forensik yang diajukan untuk *DNA profiling* menghasilkan DNA dalam jumlah dan kualitas yang tidak mencukupi (50 ng) untuk *typing*. Beruntung sekali dengan diketemukannya PCR (*Polymerase Chain Reaction*) oleh Kary Mullis pada tahun 1985, maka persoalan yang terkait dengan jumlah dan kualitas DNA tersebut tidak terlalu menjadi hambatan lagi saat ini.

Teknik PCR itu sendiri merupakan suatu cara untuk mengamplifikasi sasaran urutan asam nukleat, dengan menggunakan enzim polimerase termostabil untuk menghasilkan salinan ganda (multiple copies) dari regio asam nukleat yang spesifik secara cepat dan eksponensial, termasuk regio DNA yang tidak seperti bagian gen.(Prihartini, 1996). Prinsip dasar PCR adalah amplifikasi eksponensial yang selektif terhadap fragmen DNA tertentu. Amplifikasi dilakukan dengan enzim polimerase DNA termostabil, sepasang primer oligonukleotida dan deoxyribonucleoside triphosphatase (dNTP) baku (standar) yang tergabung (incorporated).

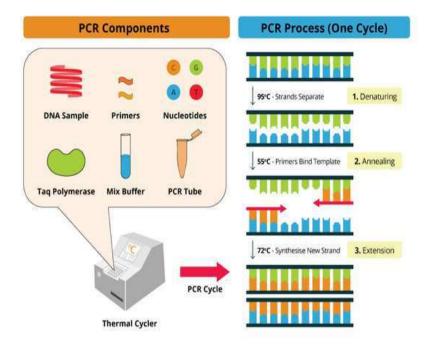


Dalam DNA yang baru disintesis. Reaksi spesifik dikontrol oleh *untai oligonukleotida DNA* dan direplikasi langsung dari *intervening* regio. Reaksi terjadi secara *eksponensial* dan urutan sasaran asli diamplifikasi dalam jutaan kali atau lebih dalam beberapa jam saja.

PCR menggunakan urutan sasaran primer DNA yang khas, serta hanya memerlukan DNA sasaran tunggal (single target DNA) yang tidak perlu di murnikan. Kepekaan dari pemeriksaan tergantung pada amplifikasi asam nukleat dan sasaran primer, di mana untuk membuktikan kepekaan pemeriksaan asam nukleat tersebut melalui otomatisasi dan tidak menggunakan bahan radioaktif.

Kekhasan reaksi PCR ditentukan oleh *primer oligonukleotida* yang melakukan hibridisasi terhadap lawan untai DNA sasaran dan secara langsung menghasilkan replikasi dari daerah yang bersangkutan (*intervening region*). Cara reaksi PCR sederhana yaitu sintesis DNA diarahkan oleh primer (*primer directed DNA synthesis*) dengan proses secara berulang-ulang dalam 30-40 seri (siklus). Pada beberapa jam sasaran amplifikasi menghasilkan DNA berlipat juta atau lebih.





Gambar 2.4 Skematik PCR

PCR adalah mutlak dalam reaksi enzimatik untuk membuat banyak cetakan segmen DNA yang khas. Proses amplifikasi ini memerlukan primer oligonukleotida, enzim termostabil DNA polimerase (*Taq DNA polymerase dari Thermus aquaticus*) dan 4 deoksi-ribo-nukleotida trifosfatase untuk sintesis DNA sasaran. Reaksi PCR berdasarkan pengulangan siklus dengan berbagai tingkatan:

Tingkat **pertama** denaturasi DNA dengan pemanasan, tingkat **kedua** anealling dari satu atau dua untaian (strand) cetakan (template), tingkat **ketiga** adalah pemanjangan (extension) pada ujung 3' dari DNA polymerase. Ketiga tingkatan tersebut merupakan satu seri dari reaksi PCR. Oleh sebab akhir 3' dari primer-primer berhadapan satu dengan lain, maka ulangan seri denaturasi, aniling primer dan hasil ekstensi primer menghasilkan akumulasi eksponen dari fragmen terbatas (diskret) yang ujungnya ditentukan oleh



OH 5' yaitu akhir dari *primer*. Amplifikasi eksponen meningkat karena pengembangan produk sintesis seri fungsi "n" sebagai cetakan dalam seri "n+1". Panjang generasi produksi dengan jumlah panjang dari kedua primer dan jarak dalam daerah sasaran DNA yang terletak pada sisi dari kedua *primer*. Dengan enzim *Taq polimerase*, PCR berjalan sederhana dengan pemanasan dan pndinginan dari bahan pemeriksaan dan secara mudah dapat diotomatisasi. Dengan program bertingkat melalui pemanasan dan pendinginan bertingkat, suhu tertentu secepat mungkin akan dapat dicapai (Saiki,1985).







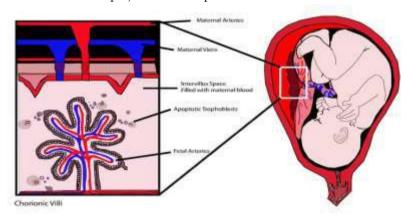
- A. Definisi Cell Free Fethal DNA (cff-DNA)
- B. Mekanisme cff-DNA/ DNA Fetus Sirkulasi Maternal
- C. Sel Berinti Fetus (*Fetal Nucleated Cells*)

 Dalam SirkulasiMaternal
- D. Cell Free Fethal mRNA/cff-mRNA/ mRNA Fetus Dalam Sirkulasi Maternal

A. Definisi Cell Free Fethal DNA [cff-DNA]

Selama kehamilan, sirkulasi janin dan ibu dipisahkan oleh selaput plasenta/placental membrane. Sehingga adanya selaput plasenta membentuk penghalang yang tidak dapat ditembus antara darah ibu dan anak; Namun, berbagai bukti telah menunjuk ke arah ketidaklengkapan hambatan tersebut untuk pertukaran secara seluler. Ada lalu lintas dua arah antara janin dan ibu selama kehamilan (Lo et al., 1996). Berbagai studi telah menunjukkan bahwa kedua sel janin utuh dan asam nukleat janin bebas sel (cffNA) melintasi plasenta dan bersirkulasi dalam aliran darah ibu (Wright & Burton, 2009).

Cell-free fetal DNA (cff-DNA) merupakan fragmen-fragmen DNA yang berasal dari fetus dan berhasil menerobos masuk ke dalam sirkulasi maternal sehingga keberadaannya dapat diketahui dengan metode isolasi DNA dari sampel berupa plasma maternal. Pada awalnya, aplikasi cff-DNA hanya dibatasi pada penentuan jenis resus, dan jenis kelamin fetus, namun, saat ini, aplikasi cff-DNA telah berkembang dengan sangat pesat karena mulai digunakan untuk mendeteksi keberadaan marker-marker spesifik untuk beberapa jenis trisomi pada fetus.

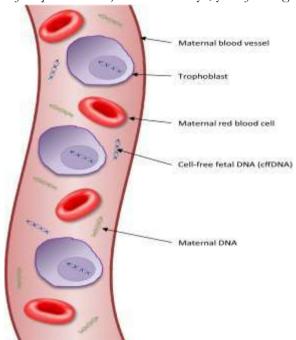


Gambar 3.1. Terbentuknya cff-DNA

DNA fetus yang berada di dalam sirkulasi maternal (plasma maternal) relatif telah sangat banyak digunakan di dunia medis, ankromosom X



(Costa et al., 2002), (2) diagnosis resus D fetus (Lo et al., 1998), dan (3) diagnosa salah satunya adalah untuk diagnosis prenatal, meliputi: (1) diagnosis beberapa penyakit yang terkait dengan diagnosis β-thalassemia (Chiu et al., 2002). Sebagian besar aplikasi di atas relatif masih berfokus pada keberadaan sekuen-sekuen DNA fetus yang diduga kuat berkorelasi dengan jenis penyakit tertentu yang diturunkan dari garis ayah (paternally inherited disease-causing sequences). Namun, salah satu kendala utama yang dihadapi oleh ilmuwan yang bergerak di bidang diagnosis prenatal berbasis cff-DNA adalah belum adanya marker universal yang dapat merepresentasikan keberadaan cff-DNA di dalam ampel yang didigunakan. Selama ini, minimnya konsentrasic ff-DNA di dalam plasma maternal seringkali membuat hasil yang didapatkan melalui diagnosis prenatal berbasis cff-DNA bernilai false positive atau justru sebaliknya, yaitu false negative.



Gambar 3.2. Fragment cff-DNA dalam sirkulasi darah ibu [The Obstetrician & Gynaecologist]



B. Mekanisme cff-DNA/DNA fetus Sirkulasi Maternal

Dalam sirkulasi darah pada ibu hamil mengandung komponen darah ibu dan komponen janin. Sirkulasi maternal terdiri dari sel-sel maternal, plasma/serum maternal dan sel fetus. Adapun sel fetus meliputi eritroblast, leukosit/limphosit, tropoblast, cell free fetal-DNA/cff-DNA dan cff-RNA. Darah dalam seorang ibu hamil, sebagian besar ilmuwan dunia masih meyakini bahwa keberadaan beberapa lapisan tropoblastik bervili mampu mencegah terjadinya percampuran antara sirkulasi fetus dengan maternal. Terdapat beberapa hipotesis mengenai asal DNA fetus dalam sirkulasi maternal antara lain: sel hematopoetik fetus, trofoblas pada plasenta, dan ditransfer secara langsung dari maternal. Pada awalnya DNA fetus diperkirakan berasal dari sel fetus yang berada dalam sirkulasi maternal. Namun mengingat keberadaan sel fetus yang sangat jarang (1 sel fetus per 1 mL darah), tentunya konsentrasi DNA fetus juga akan sangat kecil. Salah satu penjelasan yang dapat diajukan adalah DNA fetus berasal dari sel fetus yang mengalami kerusakan saat mencoba memasuki sirkulasi maternal.

Hipotesis lain menyatakan bahwa konsentrasi DNA fetus yang cukup tinggi diperkirakan berasal dari trofoblas plasenta yang mengalami apoptosis, sehingga konsentrasi DNA fetus meningkat seiring dengan perkembangan plasenta pada masa kehamilan.

DNA fetus juga dideteksi terdapat pada cairan tubuh maternal lainnya seperti amnion, urin, cairan serebrospinal dan cairan peritoneal. Konsentrasi DNA fetus pada amnion 200 kali lebih banyak dari pada plasma maternal sehingga diperkirakan DNA fetus ditransfer secara langsung dari sirkulasi fetus ke sirkulasi maternal [Bianchi DW, 2004]..

Menurut Lench *et al* [2013] Konsentrasi DNA fetus pada serum maternal ditemukan lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan konsentrasi DNA yang diperoleh dari DNA sel fetus yang diambil dari darah maternal. Pada awal kehamilan, konsentrasi DNA fetus 0,014-0,54% dalam serum maternal dan 0,39-11,9% dalam plasma maternal. Konsentrasinya akan bertambah seiiring dengan perkembangan fetus, pada akhir kehamilan konsentrasi DNA fetus 0,032-3,97% dalam serum



maternal dan 2,33-11,4% dalam plasma. Prosedur analisis DNA fetus dari serum/plasma maternal lebih mudah daripada analisis DNA dari sel fetus karena tidak memerlukan pengayaan sel fetus. Namun, berdasarkan studi dengan *nextgeneration sequencing* diketahui bahwa DNA fetus merupakan DNA terfragmentasi.

Diagnosis prenatal menggunakan DNA fetus terbatas hanya pada mutasi yang diturunkan secara paternal. Keterbatasan ini disebabkan oleh belum adanya teknik untuk memisahkan DNA fetus dengan DNA maternal pada plasma. Teknik elektroforesis pernah dimanfaatkan untuk pengayaan DNA fetus.

Namun, di sisi lain, beberapa ilmuwan lain justru mulai menemukan fakta bahwa barier tersebut ternyata dapat ditembus oleh beberapa sel fetus untuk kemudian masuk kedalam sirkulasi maternal. Fakta inilah yang kemudian menginspirasi Lo et al., (1996) untuk mengajukan teori bahwa secara alamiah, dalam tubuh maternal yang sedang hamil senantiasa terjadi lalulintas molekul dan bahkan sel dari fetus menuju maternal maupun sebaliknya, dari maternal menuju fetus. Selanjutnya, penelitian di bidang bidirectional traffic relatif terus berkembang dan salah satu topik yang berkembang dengan sangat pesat adalah tentang cell-free fetal DNA (cff-DNA) atau fethal free DNA.

Fethal free DNA merupakan nucleus DNA [nuDNA/DNA inti]. Adanya DNA inti pada fethal free menunjukkan kandungan satellit DNA yang didalamya terdapat short tandem repeat [STR]. STR yang terdapat di dalam fethal free DNA merupakan fusi dari DNA/STR yang berasal dari ayah dan ibu, sesuai hukum mendel.

Dalam pemeriksaan allel dari setiap STR digunakan kontrol K562 sebagai kontrol positif dalam menilai alel tersebut. Selanjutnya membanding alel dari darah ibu, alel fethal free DNA [fetus] dan alel seorang bapak.



C. Sel Berinti Fetus [Fetal Nucleated Cells] Dalam Sirkulasi Maternal

Beberapa jenis sel beriti fetus atau sering disebut hanya sel fetus atau sel fetal yang sudah dilaporkan terdapat dalam sirkulasi maternal seperti: trofoblas, leukosit/limphosit dan eritroblast/eritrosit fetus berinti (NRBC/Nucleated Red Blood Cell). Ada satu hingga enam sel janin per mililiter darah dari kehamilan normal wanita.

Adanya *fetal nucleated cells* atau sel fetal dalam sirkulasi maternal ini merupakan sebuah pengetahuan baru dalam penegakan diagnosis prenatal noninvasif, terutama untuk diagnosis seks janin dan kelainan kromosom dengan kariotipe sederhana.

Penggunaan sel berinti fetus pada sirkulasi maternal untuk tes diagnostik pelayanan genetik belum rutin dilakukan. Kendala utamanya adalah keberadaan sel fetus yang sangat jarang yaitu satu sel fetus dalam satu mililiter darah maternal.[Litton C et al, 2009]

Kendala lain dalam penggunaan sel fetus pada sirkulasi maternal adalah terjadinya apoptosis pada sel fetus saat memasuki sirkulasi maternal. Hal ini diperkirakan terjadi karena eritroblas fetus memasuki lingkungan yang kaya akan oksigen pada sirkulasi maternal [Biachi DW, et al, 2004]. Oleh karena sangat tidak mudah untuk mengisolasi satu sel berinti fetus diantara jutaan sel maternal sehinggga diperlukan suatu pengayaan.

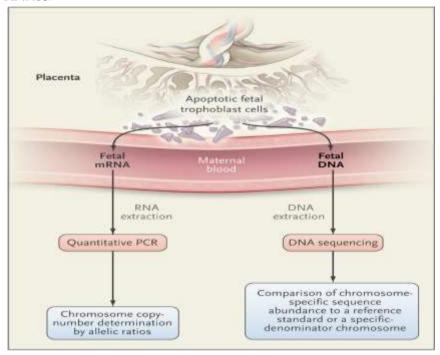
Ukuran DNA fetus pada cff-DNA yang lebih pendek dibandingkan dengan DNA maternal memungkinkan dilakukan elektroforesis untuk kemudian cff-DNA/ fetus DNA tersebut dapat dimurnikan, namun metode ini menyebabkan DNA fetus banyak yang terdegradasi dan terdapat peluang terjadi kontaminasi DNA lain.

D. Cell-free fetal mRNA/cff-mRNA/ mRNA Fetus Dalam Sirkulasi Maternal

Selain sel fetus dan cell free fetal-DNA yang ada dalam sirkulasi maternal oleh ibu hamil, terdapat juga cell-free fetal mRNA/mRNA fetus. Poon *et al.* pada tahun 2000 meneliti tentang mRNA fetus pada plasma maternal. Penggunaan mRNA fetus sebagai alternatif karena adanya



keterbatasan DNA fetus. Keberadaan mRNA fetus pada sirkulasi maternal dalam jumlah sangat kecil dan tidak setiap kehamilan selalu didapatkan adanya mRNA, mengingat mRNA adalah molekul yang labil dan mudah terdegradasi. Kestabilitannya dalam plasma, mRNA ini disebabkan oleh suatu partikel yang mampu melindungi mRNA dari RNAse.



Gambar 3.3 Proses isolasi RNA dan DNA fetus

Keunggulan mRNA fetus dibandingkan dengan DNA fetus adalah dimungkinkannya untuk memperoleh mRNA spesifik plasenta yang tidak diekspresikan pada jaringan maternal. Dasar pemikiran ini adalah jika DNA fetus yang terdapat dalam sirkulasi maternal berasal dari trofoblas, maka kemungkinan mRNA yang diekspresikan secara spesifik pada trofoblas dapat ditemukan dalam sirkulasi maternal [Hahn S et al, 2008]







Identifikasi personal merupakan suatu masalah dalam kasus pidana maupun perdata. Menentukan identitas personal dengan tepat amat penting dalam penyidikan karena adanya kekeliruan dapat berakibat fatal dalam proses peradilan (Idries, 1997).

Menurut Sopher (1976), pada prinsipnya identifikasi personal korban meninggal di bidang kedokteran forensik merupakan serangkaian tindakan pembandingan data hasil pemeriksaan terhadap mayat (data postmortem) dengan data tersangka korban saat masih hidup (data antemortem). Data tersebut kemudian akan dibandingkan dengan data milik orang yang diduga sebagai korban, di mana data tersebut dapat diperoleh dari keluarga, rekam medis, rekam medis gigi, data polisi, dan lain sebagainya. Dengan adanya kesesuaian antara data antemortem dan data postmortem, akan mempersempit jumlah orang yang diduga sebagai korban. Dengan demikian hal ini akan semakin memperkuat dugaan bahwa korban adalah benar-benar orang yang telah diduga selama ini.

Identifikasi dalam kedokteran forensik diantaranya sidik jari (daktiloskopi), pemeriksaan property, medis, gigi-geligi, serologi dan metode eksklusif. Saat ini metode identifikasi telah berkembang kearah forensik molekuler. Forensik molekular pertamakali diperkenalkan oleh Sir Alex Jefreys tahun 1985, yang memanfaatkan pengetahuan kedokteran dan biologi pada tingkat molekul atau DNA (Deoxyribonucleotic acid).

Deoxyribonucleotic acid [DNA] merupakan unit keturunan terkecil dan terdapat pada semua mahluk hidup mulai dari mikroorganisme sampai organisme tingkat tinggi seperti manusia, hewan dan tanaman. Menurut Notosoehardjo (2000) tiap jaringan mempunyai kandungan DNA yang berbeda-beda tergantung struktur serta komposisi selnya. Jaringan dengan banyak sel berinti dan sedikit jaringan ikat umumnya mempunyai kadar DNA tinggi.

Perkembangan identifikasi melalui analisis DNA ini semakin maju, para ilmuwan mencari sebuah terobosan baru, sehingga bisa memberi sebuah solusi dalam identifikasi tersebut. Diantaranya yakni penggunaan *cell-free fetal DNA* (cff-DNA) dalam identifikasi khususnya dalam *paternity test.*/ tes keayahan.

Penelitian di bidang *cell-free fetal DNA* (cff-DNA) relatif terus berkembang dan salah satunya yakni identifikasi atau paternitas test. *Cell-free fetal DNA* (cff-DNA) merupakan fragmen-fragmen DNA yang berasal dari fetus dan berhasil menerobos masuk ke dalam sirkulasi maternal sehingga keberadaannya dapat diketahui dengan metode isolasi DNA dari sampel berupa plasma maternal. Pada

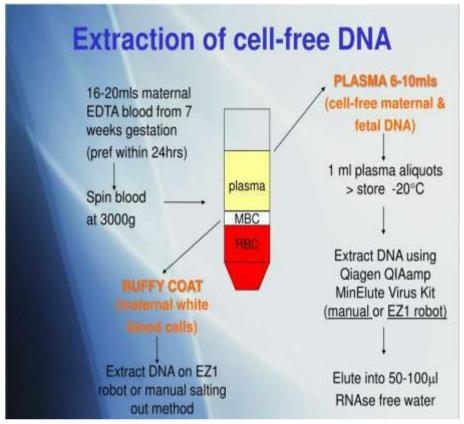


awalnya, aplikasi cff-DNA hanya dibatasi pada penentuan jenis resus, dan jenis kelamin fetus, namun, saat ini, aplikasi cff-DNA telah berkembang dengan sangat pesat karena mulai digunakan untuk mendeteksi keberadaan marker-marker spesifik untuk beberapa jenis trisomi pada fetus

DNA fetus yang berada di dalam sirkulasi maternal (plasma maternal) relatif telah sangat banyak digunakan di dunia medis, salah satunya adalah untuk diagnosis prenatal, meliputi: (1) diagnosis beberapa penyakit yang terkait dengan kromosom X (Costa *et al.*, 2002), (2) diagnosis resus D fetus (Lo *et al.*, 1998), dan (3) diagnosis β-thalassemia (Chiu *et al.*, 2002). Sebagian besar aplikasi di atas relatif masih befokus pada keberadaan sekuen-sekuen DNA fetus yang diduga kuat berkorelasi dengan jenis penyakit tertentu yang diturunkan dari garis ayah (*paternally inherited disease-causing sequences*). Namun, salah satu kendala utama yang dihadapi oleh ilmuwan yang bergerak di bidang diagnosis prenatal berbasis cff-DNA adalah belum adanya marker universal yang dapat merepresentasikan keberadaan cff-DNA di dalam sampel yang didigunakan. Selama ini, minimnya konsentrasi cff-DNA di dalam plasma maternal

Dalam pembahasan ini, setelah dilakukan pengambilan sampel terhadap responden yang sebelumnya telah tandatangan inform consent ikut dalam penelitian ini serta kesediaan dalam pengambilan sampel darah tepi. Darah diambil dari pasangan suami-istri yang dalam keadaan hamil trisemester 1-2. Darah dalam EDTA disentrifuse $1600~{\rm rpm}$ selama $10~{\rm menit}$, supernatant (plasma) dipindah ke tabung ependorf disentrifuse $1600~{\rm rpm}$ selama $10~{\rm menit}$ dan supernatan diambil.





Gambar. Bagan proses isolasi cffDNA

Proses isolasi DNA dari darah responden tersebut melalui metode DNAzol. Metode DNAzol merupakan cara ekstraksi/isolasi DNA melalui sistem organik memiliki keakurasian yang tinggi (Yudianto, 2010). Hasil isolasi DNA sampel yang berasal dari maternal pellet dan maternal plasma dilanjutkan pengukuran kadar dan kemurnian DNA sampel menggunakan *UV-Visible Spectrophotometer* panjang gelombang 260 nm sebelum dilakukan amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Adapun hasil pengukuran kadar DNA sampel sebagai berikut:



Tabel 4.1.Kadar DNA sampel darah maternal

Sampel	Kadar DNA maternal pellet (µg/ml)	Kadar DNA maternal plasma (µg/ml)
1	234,50	28,30
2	213,45	24,50
3	254,89	21,30
4	203,55	22,87
5	278,50	23,67

Dari tabel 4.1 di atas, kadar DNA hasil isolasi dari darah tepi [maternal] dari 5 sampel masing-masing dari maternal plasma dan maternal pellet. Kadar DNAnya masih dapat digunakan dalam proses DNA *profiling*, menurut Notosoehardjo (1999) mensyaratkan jumlah atau kadar DNA sekitar 20 µg/ml untuk *typing*. (Muladno, 2000).

Hasil ekstraksi/isolasi sampel tersebut mendapatkan kadar DNA, baik kadar DNA bapak, kadar DNA ibu [maternal pelet] dan kadar DNA anak [maternal plasma]. Kadar DNA dari maternal plasma [kadar DNA anak] yang merupakan cff-DNA yakni rerata kadar DNAnya 24,70 µg/ml. Kadar DNAnya masih dapat digunakan dalam proses DNA profiling khususnya dalam paternity test, menurut Notosoehardjo (1999) mensyaratkan jumlah atau kadar DNA sekitar 20 µg/ml untuk typing. (Muladno, 2000). Kadar yang rendah dapat dilihat dari hasil visualisasi amplifikasi Polymerase Chain Reaction [PCR] melalui polyacrylamid agarose gel electrophorese [PAGE] dengan staining silver menunjukkan pita/bandnya lebih samara/tipis jika dibanding dengan dari ibu [maternal pellet] atau bapak.

Tes paternitas [paternity test/tes keayahan] merupakan tes analisis DNA untuk menentukan apakah seorang pria adalah ayah biologis dari seorang anak. Kita semua mewarisi DNA (materi genetik) dari orang tua biologis kita. Tes paternitas membandingkan pola DNA anak dengan terduga ayah untuk memeriksa bukti pewarisan DNA yang menunjukkan kepastian adanya hubungan biologis. Setiap orang memiliki DNA yang unik. DNA adalah materi genetik yang membawa informasi yang dapat



diturunkan. Di dalam sel manusia DNA dapat ditemukan di dalam inti sel dan di dalam mitokondria. Di dalam inti sel, DNA membentuk satu kesatuan untaian yang disebut kromosom. Setiap sel manusia yang normal memiliki 46 kromosom yang terdiri dari 22 pasang kromosom somatik dan 1 pasang kromosom sex (XX atau XY). Setiap anak akan menerima setengah pasang kromosom dari ayah dan setengah pasang kromosom lainnya dari ibu sehingga setiap individu membawa sifat yang diturunkan baik dari ibu maupun ayah

Tes paternitas adalah analisis DNA untuk mencari hubungan kekerabatan antar individu. Misalnya untuk mencari bukti siapa ayah biologis dari seorang anak, atau untuk persoalan hukum antara lain warisan, adopsi, perwalian anak, tunjangan anak, imigrasi, family reunion, dan masalah forensik. Sebagian besar masyarakat pasti sudah pernah mendengar mengenai analisis DNA. Pada umumnya masyarakat pun mengetahui manfaat tes DNA untuk mengungkap orangtua biologis anak. Selain itu, analisis DNA juga bisa untuk mengidentifikasi korban kecelakaan dan bencana alam, serta mengungkap pelaku kekerasan seksua

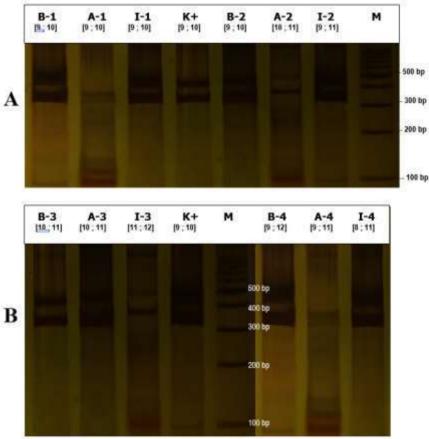
Analisis DNA dilakukan dengan berbagai alasan seperti persoalan pribadi dan hukum antara lain: tunjangan anak, perwalian anak, adopsi, imigrasi, warisan dan masalah forensic (dalam Identifikasi korban pembunuhan). Ketika seseorang dengan alasan yang sangat beragam dan pribadi ingin tahu akan identitasnya, maka salah satu cara yang dapat dilakukan untuk menyelesaikan masalah tersebut adalah identifikasi DNA (Deoxyribo Nucleic Acid). Identifikasi DNA dapat dimanfaatkan untuk mengetahui hubungan biologis antar individu dalam sebuah keluarga dengan cara membandingkan pola DNA individu-individu tersebut.

Tes paternitas dilakukan dengan membandingkan susunan informasi genetik, yang dalam bentuk AGTCACACACCAATTT.. Setiap orang tua memberi kontribusi masing-masing 50% DNA-nya, maka anak biologisnya akan memiliki profil DNA yang yang sama dengan kedua orang tuanya. Sebetulnya ada beberapa marka genetik yang dapat digunakan dalam tes paternitas. Namun, sekarang-sekarang ini yang secara

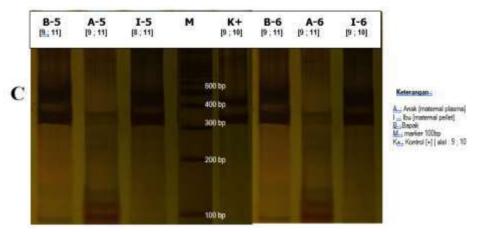


luas dipergunakan oleh laboratorium forensik di seluruh dunia adalah marka STR (*short tandem repeat*).

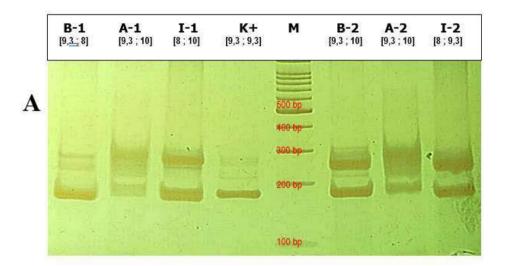
Pembahasan dalama buku ini menggunakan short tandem repeat [STR] Combined DNA Index System [CODIS] 13 lokus CSF1PO [321bp–357bp], THO1 [156bp-195bp], TPOX [262bp-290bp], vWA [123bp–171bp], D3S1358 [115bp-147bp], FGA [322bp-444bp], D5S818 [119bp-155bp], D7S820 [215bp-247bp], D8S1179 [2013bp-247bp], D13S317 [169bp-201bp], D16S539 [264bp-304bp], D18S51 [290bp-366bp] dan D21S11 [203bp-259bp] serta Amelogenin [X: 106bp; Y: 112bp]. Berikut ini beberapa hasil visualisasi PCR melalui polyacrylamid agarose composit gel [PAGE] dengan pewarnaan silver staining:



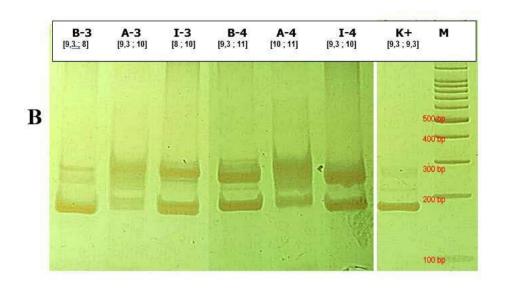


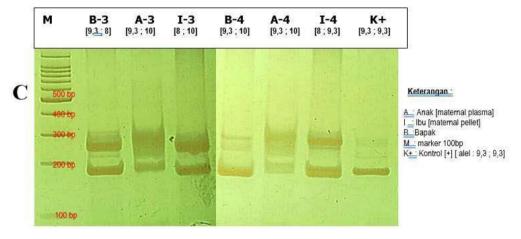


Gambar 4.1 **A-B-C**. Visualisasi hasil amplifikasi lokus CSFIPO [321bp -357bp]



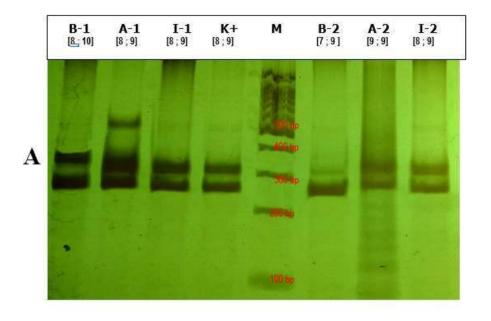


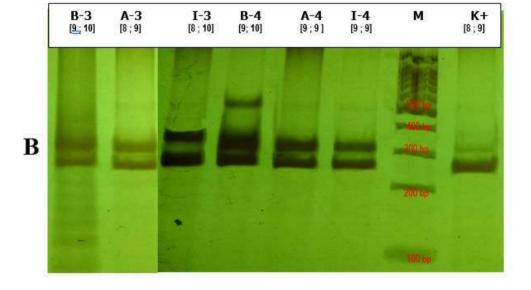




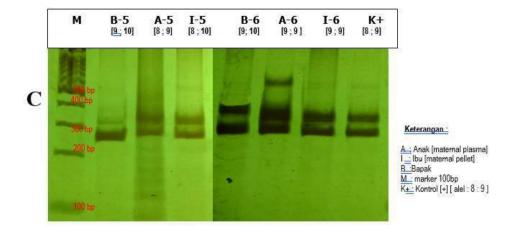
Gambar 4.2 **A-B-C**. Visualisasi hasil amplifikasi lokus THO1 [156bp -195bp]



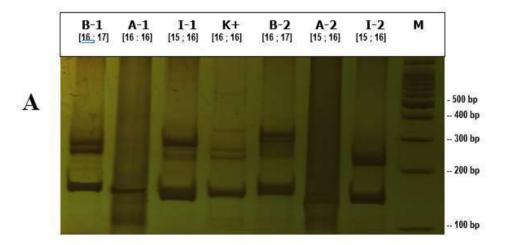




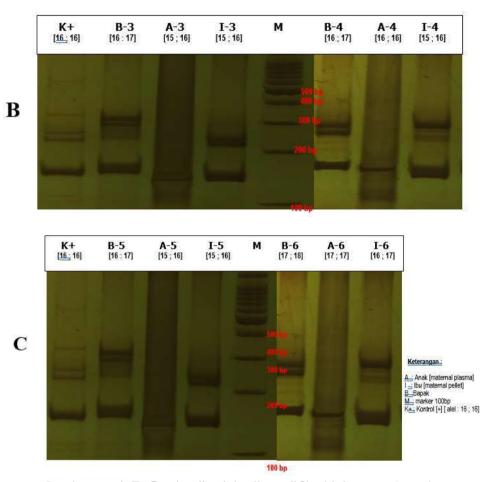




Gambar 4.3 **A-B-C**. Visualisasi hasil amplifikasi lokus TPOX [262bp -290bp]4







Gambar 4.4 **A-B-C**. Visualisasi hasil amplifikasi lokus vWA[123bp - 171bp]

Berikut ini table rekapitulasi hasil pembacaan alel masing – masing lokus pada setiap sampel, sebagaimana tabel di bawah ini :



Tabel 4.2. Rekapitulasi hasil pembacaan alel pada semua sampel

SAMPEL		ALEL LOKUS STR CODIS							
		CSF1PO	THO1	TPOX	vWA	D3S1358	FGA	D5S818	
Sampel 1	Bapak	9;10	9,3;8	8;10	16;17	16;16	21;25	11;12	
	Anak{maternal plasma]	9;10	9,3;10	8;9	16;16	15;16	21;24	11;13	
	Ibu {maternal pellet]	9;10	8;10	8;9	15;16	15;16	21;24	11;13	
Sampel 2	Bapak	9;10	9,3;10	7;9	16;17	16;16	21;24	11;11	
	Anak {maternal plasma]	10;11	9,3;10	9;9	15;16	15;16	21;24	11;13	
	Ibu (maternal pellet)	9;11	8;9,3	8;9	15;16	15;17	21;24	11;13	
Sampel 3	Bapak	10;11	9,3;8	9;10	16;17	15;16	21;21	12;12	
	Anak (maternal plasma)	10;11	9,3;10	8;9	15;16	15;16	21;24	12;13	
	Ibu {maternal pellet]	11;12	8;10	8;10	15;16	15;16	21;24	11;11	
Sampel 4	Bapak	9;12	9,3;11	9;10	16;17	16;16	21;25	11;12	
	Anak {maternal plasma]	9;11	10;11	9;9	16;16	16;16	21;25	12;13	
	Ibu (maternal pellet)	8;11	9,3;10	9;9	15;16	15;16	21;24	12;13	
Sampel 5	Bapak	9;11	9,3;8	9;10	16;17	16;16	21;25	11;12	
	Anak (maternal plasma)	9;11	9,3;10	8;9	15;16	15;16	21;25	11;13	
	Ibu {maternal pellet]	8;11	8;10	8;10	15;16	15;16	21;24	11;13	

SAMPEL		ALEL LOKUS STR CODIS							
		D7S820	D8S1179	D13S317	D16S529	D18S51	D21S11	Amel	
Sampel 1	Bapak	11;10	13;13	7;8	11;13	15;16	29;31	XY	
	Anak [maternal plasma]	11;13	13;13	7;8	11;13	15;16	31;31	X	
	Ibu {maternal pellet]	11;13	13;13	8;8	12;13	15;16	29;31	XY	
Sampel 2	Bapak	10;11	12;13	7;8	11;11	15;15	30;31	XY	
	Anak {maternal plasma]	10;13	12;13	8;8	11;13	15;16	31;31	X	
	Ibu {maternal pellet]	11;13	13;13	8;8	11;13	15;16	29;31	X	
Sampel 3	Bapak	10;12	11;12	8;8	12;13	16;16	30;31	XY	
	Anak {maternal plasma]	12;13	11;13	7;8	11;13	15;16	30;31	X	
	Ibu {maternal pellet]	11;13	13;13	7;8	11;13	15;16	29;31	XY	
Sampel 4	Bapak	11;12	12;13	8;8	13;13	15;15	29;30	XY	
	Anak {maternal plasma]	12;13	12;13	7;8	11;13	15;15	29;30	X	
	Ibu {maternal pellet]	12;13	12;13	7;8	11;13	15;16	30;31	X	
Sampel 5	Bapak	12;12	12;12	7;7	11;12	16;16	30;31	XY	
	Anak (maternal plasma)	12;13	12;12	7;8	11;13	15;16	31;31	X	
	Ibu {maternal pellet]	11;13	12;12	8;8	11;13	15;15	29;31	XY	

Dari tabel di atas, menunjukkan semua alel lokus-lokus STR CODIS pada semua sampel dalam penelitian ini, memiliki pola maternal-paternal inherited, yakni alel pada anak [maternal plasma] separuh berasal dari bapak kandung dan separuhnya dari ibu kanndung. Ke 13 lokus STR CODIS tersebut memiliki karakteristik/pola seperti hal tersebut, mengikuti hukum mendel.

Hasil visualisasi amplifikasi PCR dari 13 lokus-lokus STR CODIS tersebut menunjukkan matching antara bapak, ibu dan anak melalui control alel k562. Ini ditunjukkan melalui keluarnya pita/band sesuai besar amplifikasi [amplicon size] setiap lokusnya. Semua sampel [5 buah sampel pasangan suami istri] pola alelnya



mengikuti hukum mandel, yang menyatakan bahwa alel anak didapatkan 50% alel bapak dan 50% alel ibu. Identifikasi DNA untuk tes paternitas dilakukan dengan menganalisa pola DNA menggunakan marka STR (short tandem repeat). STR adalah lokus DNA yang tersusun atas pengulangan 2-6 basa. Dalam genom manusia dapat ditemukan pengulangan basa yang bervariasi jumlah dan jenisnya. Identifikasi DNA dengan penanda STR merupakan salah satu prosedur tes DNA yang sangat sensitif karena penanda STR memiliki tingkat variasi yang tinggi baik antar lokus STR maupun antar individu.

Sebagai kontrol positif yakni K562 yang merupakan kontrol positif dalam pemeriksaan analisis DNA dengan STR CODIS dan marker ladder 100 bp. Tes analisis DNA memiliki nilai 100% akurat bila dikerjakan dengan benar. Tes analisis DNA ini memberikan hasil lebih dari 99.99% probabilitas paternitas bila DNA terduga ayah dan DNA anak cocok (*matched*). Apabila DNA terduga ayah dan anak tidak cocok (*mismatched*) maka terduga ayah yang di tes 100% bukanlah merupakan ayah biologis anak tersebut. Konfirmasi dilakukan dengan mengulang tes terhadap terduga ayah.



BAB 5 PENUTUP



A. Kesimpulan

B. Saran

A. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini ternyata bahwa isolasi DNA dari maternal plasma dari ibu hamil tri semester satu - dua masih dapat menjadi bahan alternatif dalam paternitas tes, yang merupakan teknik non invasif Pada penelitian ini menggunakan 13 lokus STR CODIS, lokus ini merupakan metode yang masuk akal, kuat dan efisien sehingga bermanfaat pada kasus forensik, ditunjukkan oleh hasil visualisasi amplifikasi PCR dengan pita/band alel melalui kontrol [+] k562 yakni matching, alel bapak, alel ibu dan alel anak .

B. Saran

Pengembangam penelitian berkelanjutan terhadap lokus-lokus mtDNA dan deteksi penyakit-penyakit kelainan genetik.



DAFTAR PUSTAKA

- Affoed RL and Caskey CT,1994.DNA analysis in Forensic disease and animal identification.Curr.opin.Biotech.5:29-32
- Atmaja DS, 2005, Peranan Sidik jari DNA dalam Bidang Forensik ,Seminar Nasional Aplikasi DNA Finger Printing dalam Bidang Kedokteran, 29 Agustus 2005, PS Bioteknologi UGM
- Becker; Couuper H, 2003, The World of The Cell, 5th Edition, Benjamin Cummings, San Francisco Boston New york.
- Butler,JM,2001, STR Analysis for human testing,STR Typing.Current protocols in Human Genetic Unit.14.8,pp 1-37
- Butler, JM, 2003, Forensic DNA Typing, Academic Press, Sandiego-Florida, page 28-30, page 59-96.
- Cooper M.G, Hausman Robert E, 2004, The Cell A Molecular Approach, Third Edition, ASM Press Washington, DC.
- Davis LG; Mark D.Dibner; James F.Battey,1986,Basic Methodes in Molecular Biology, Elsevier, New York
- Fawcet DW,2002, Histology, Edisi 12 Penerbit Buku Kedokteran, EGC Jakarta
- Gibson, J.2003, Modern Physiology and Anatomy For Nurses, 1st ed. Published by Arrangement with Blackwell Science Limited, Oxford, page 238-239.
- Hammond HA and Caskey CT,1994.Human DNA fingerprinting using STR loci, Methodes Mol.Cell.5:78-86
- Henry A.E, 1992, *PCR* Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, W.H.Freeman and Company, New York.
- Houk MH, 2001, Mute Witnesses Trace Evidence Analysis, Academic Press, Tokyo, page 87-117
- Idries, A.M, 1997, Pedoman Ilmu Kedokteran Forensik, Edisi pertama, Jakarta, Penerbit Binarupa Aksara.
- Jackson M Kelly, 1990, The Polymerase Chain Reaction, Simposium DNA Probing: Teknik dan Penerapan Klinis, HKKI.



- Jusuf M, 2001, GENETIKA I Struktur & Ekspresi Gen, Sagung Seto, Jakarta
- Kesey W & Alice M,2000, The Critical stage of Friction Ridge and patern formation, *Silver State Journal of Forensic Identification*, Vol.8,issue 1
- Lewis R, 2001, Human Genetics Conception and Application, 2nd Ed Wm.C.Brown Publishers, Toronto, page 139-180.
- Mark A.F, 1991, Forensik DNA Technology, Lewis Publishers inc.
- Murray et al, 1997, Biokimia Harper, edisi 24, EGC, hal 366-370
- Muladno, 2002, Seputar tehnologi rekayasa genetik, Edisi pertama, Bogor, Pustaka.
- Notosoehardjo I, 1999, Penentuan jenis kelamin berdasarkan Pemeriksaan DNA dan Antropometri tulang, Disertasi Doktor, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Peter P.B,2004, Teri's Find a forensic study in authentication, Biro Fine art restoration and forensic studies in art. Pp 23-25.
- Watson et.al, 1986, Molecular Biology of The Gene, 4nd.Ed. Cummings Publishing Company,Inc.
- Westwood SA & Werret DJ,1990, An evaluation of the Polymerase Chain Reaction method for forensic application, *Elsevier Science International*, pp 201-215.
- Watson D. J.et al, 1988, DNA Rekombinan, Penerbit Erlangga, 1988.
- William G.E,1992, Introduction Forensic Science, 2 ed, CRC Press Boca Rotan Florida, page 232-259.
- Zainuddin M, 2000, Metodologi Penelitian, Kumpulan kuliah Pascasarjana UNAIR.





TENTANG PENULIS

AHMAD YUDIANTO, Lahir 30 Mei 1973 di Sumenep Madura, Pendidikan : Profesi Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga [UNAIR] 1997, Sarjana Hukum Universitas

Merdeka Surabaya 2004, Spesialis Forensik-Medikolegal Fakultas Kedokteran UNAIR 2005, Magister Ilmu Kedokteran Dasar Pascasarjana UNAIR 2006, Doktor Ilmu Kedokteran Pascasarjana UNAIR 2010, Konsultan Sero-Biomol Forensik – Kolegium Kedokteran Forensik Indonesia 2017.

Saat Ini Sebagai SMF Kedokteran Forensik RSUD Dr Soetomo & Dosen Fakultas Kedokteran UNAIR [2008-Sekarang]. Mata Kuliah Yang Diampu: Ilmu Kedokteran Forensik, Ilmu Forensik, DVI, Serologi Forensik, DNA Forensik.

Sebagai Pengajar Ilmu Kedokteran Forensik Pada Beberapa Fakultas Kesehatan PTS di Jawa Timur. Saat Ini Menjabat KPS S2 Ilmu Forensik Sekolah Pascasarjana UNAIR [2010-Sekarang] & KPS PPDS-1 Ilmu Kedokteran Forensik & Studi Medikolegal Fakultas Kedokteran UNAIR [2015-Sekarang]. Peneliti di Kelompok Studi Human Genetik Institut Tropical Desease UNAIR, Publikasi Nasional Dan Internasional, Buku-Buku Karangannya: Identifikasi Pada Kerangka Tidak Dikenal [2012], Panduan Praktis Serologi Forensik [2013], Panduan Laboratorium DNA Forensik [2015], Pemeriksaan Identifikasi; Forensik Molekuler [2015].





www.scopindo.com

