



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5914042, 5914043, Fax (031) 5981841
Website : <http://www.unair.ac.id>; e-mail : rektor@unair.ac.id

SALINAN

**KEPUTUSAN
REKTOR UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOMOR 1520/UN3/2019**

TENTANG

**PELAKSANAAN PENELITIAN PENDANAAN DIREKTORAT RISET DAN
PENGABDIAN MASYARAKAT KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN
PENDIDIKAN TINGGI DI UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 2019**

REKTOR UNIVERSITAS AIRLANGGA,

- Menimbang : a. bahwa dalam rangka pelaksanaan penelitian sebagai salah satu wujud dari Tri Dharma Perguruan Tinggi, maka perlu menetapkan para peneliti dan judul penelitian dimaksud;
- b. bahwa sesuai hasil seleksi proposal penelitian yang didanai melalui Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Tahun 2019, maka perlu menetapkan para peneliti dan judul penelitian;
- c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a dan huruf b, perlu menetapkan Keputusan Rektor tentang Pelaksanaan Penelitian Pendanaan Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi di Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2019;
- Mengingat : 1. Undang-Undang Nomor 20 Tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2003 Nomor 78, Tambahan Lembaran Negara Nomor 4301);
2. Undang - Undang Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 158, Tambahan Lembaran Negara Tahun 2012 Nomor 5336);

3. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 57 Tahun 1954 tentang Pendirian Universitas Airlangga di Surabaya sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Pemerintah Nomor 3 Tahun 1955 tentang Pengubahan Peraturan Pemerintah Nomor 57 Tahun 1954.(Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1954 Nomor 99 Tambahan Lembaran Negara Nomor 695 juncto Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1955 Nomor 4 Tambahan Lembaran Negara Nomor 748);
4. Peraturan Pemerintah Nomor 37 Tahun 2009 tentang Dosen (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 76, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5007);
5. Peraturan Pemerintah Nomor 4 Tahun 2014 tentang Penyelenggaraan Pendidikan Tinggi dan Pengelolaan Perguruan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 16, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5500);
6. Peraturan Pemerintah Nomor 30 Tahun 2014 tentang Statuta Universitas Airlangga (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2014 Nomor 100, Tambahan Lembaran Negara Nomor 5535);
7. Peraturan Pemerintah Nomor 26 Tahun 2015 tentang Bentuk dan Mekanisme Pendanaan Perguruan Tinggi Negeri Badan Hukum (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2015 Nomor 110, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5699);
8. Keputusan Majelis Wali Amanat Universitas Airlangga Nomor 1032/UN3.MWA/K/2015 tentang Pengangkatan Rektor Universitas Airlangga Periode 2015-2020;
9. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 42 Tahun 2016 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Airlangga sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Rektor Nomor 39 Tahun 2017;
10. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 38 Tahun 2017 Tentang Peraturan Pendidikan Universitas Airlangga sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Rektor Nomor 01 Tahun 2018;
11. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 1280/UN3/2015 tentang Pembentukan Lembaga Penelitian dan Inovasi;
12. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 1285/UN3/2015 tentang Pengangkatan Ketua pada Lembaga dan Kepala Perpustakaan di Lingkungan Universitas Airlangga;

13. Keputusan Direktur Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Nomor 6/E/KPT/2019 tentang Penerima Pendanaan Penelitian dan Pengabdian Masyarakat di Perguruan Tinggi Negeri Badan Hukum Tahun Anggaran 2019;
14. Kontrak Kinerja Menteri Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi dengan Rektor Perguruan Tinggi Berbadan Hukum Tahun 2019, tanggal 12 Maret 2019;

Memperhatikan : Surat Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga Nomor 489/UN3.14/LT/2019, Tanggal 28 Maret 2019, perihal Permohonan Keputusan Rektor tentang Pelaksanaan Penelitian Pendanaan Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi di Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2019.

MEMUTUSKAN :

MENETAPKAN : KEPUTUSAN REKTOR TENTANG PELAKSANAAN PENELITIAN PENDANAAN DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI DI UNIVERSITAS AIRLANGGA TAHUN ANGGARAN 2019.

KESATU : Menetapkan Hasil Seleksi Proposal Penelitian Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi di Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2019.

KEDUA : Penerima Penelitian Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi di Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2019 sebanyak 267 (dua ratus enam puluh tujuh) Judul, dengan susunan nama Tim Peneliti sebagaimana tercantum dalam Lampiran yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari keputusan Rektor ini.

KETIGA : Biaya untuk pelaksanaan kegiatan penelitian sebagaimana dimaksud pada diktum KEDUA adalah sebesar Rp. 34.245.119.000,00 (tiga puluh empat milyar dua ratus empat puluh lima juta seratus sembilan belas ribu rupiah).

KEEMPAT : Dalam melaksanakan tugasnya, penerima penelitian sebagaimana dimaksud pada diktum KEDUA, bekerja secara jujur dan transparan dengan berpedoman pada peraturan dan ketentuan-ketentuan yang berlaku, serta bertanggungjawab kepada Rektor melalui Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga.

- KELIMA : Jangka waktu pelaksanaan penelitian sebagaimana dimaksud pada diktum KESATU adalah selama **1 April 2019 s.d 16 November 2019**.
- KEENAM : Biaya pelaksanaan Keputusan ini dibebankan pada DIPA Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Nomor SP DIPA-042.06.1.401516/2019, tanggal 5 Desember 2018.
- KETUJUH : Apabila di kemudian hari ditemukan data yang tidak sesuai dengan fakta maka status penelitian yang bersangkutan dinyatakan gugur.
- KEDELAPAN : Keputusan ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Salinan disampaikan Yth :

1. Pimpinan Unit Kerja di Lingkungan Unair
2. Yang bersangkutan

Salinan sesuai dengan aslinya
Sekretaris Universitas,



KOKO SRIMALYO
NIP 196602281990021001

Ditetapkan di Surabaya
pada tanggal 1 April 2019

REKTOR,

TTD

MOHAMMAD NASIH
NIP 196508061992031002

LAMPIRAN KEPUTUSAN REKTOR UNIVERSITAS AIRLANGGA

NOMOR : 893/UN3/2018, TANGGAL 1 APRIL 2018

TENTANG : PELAKSANAAN PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA TAHUN ANGGARAN 2018

NO	TIM PENELITI	NIDN	FAK	SKEMA	JUDUL PENELITIAN	LUARAN WAJIB TAHUN 2019	LUARAN TAMBAHAN TAHUN 2019	STATUS	DANA (Rp)
1	1. Dr. Aditiawarman, dr., SpOG(K) 2. Prof. Dr. Suhartati, dr., M.S. 3. Lina Lukitasari, dr., M.Si.	8837700016 0009048008	FK	Penelitian Disertasi Doktor (PDD)	Efek Defisiensi Enzim Glukosa-6-Fosfat Dehidrogenase terhadap Disfungsi Endotel Palsenta pada Pasien Prekelampsia	Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional: Accepted/ Published		Baru	60.000.000
2	1. Dr. Ahmad Yudianto, dr., Sp.FM(K), S.H., M.Kes. 2. Dr. Masniari Novita, drg., M.Kes. 3. Muhammad Afiful Jauhani, dr.	8888130017 0025116803	FK	Penelitian Tesis Magister (PTM)	ESTIMASI UMUR MELALUI METHILASI DNA PADA SAMPEL PEMERIKSAAN DARAH	Dua (2) Prosiding dalam Pertemuan Ilmiah Internasional: Sudah Terbit/ Sudah Dilaksanakan	Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Terakreditasi: Accepted/ Published	Baru	58.250.000
3	1. Andriati, dr., SpKFR 2. Dr. Yayan Sakti Suryandaru, S.Sos., M.Si. 3. Nanang Haryono, S.IP., M.Si.	0004016106 0002107002 0722097901	FK	Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT)	Pengembangan Model Kapasitas Institusi Pelayanan Kesehatan Era Reformasi Birokrasi Untuk Meningkatkan Pelayanan Kesehatan di Rumah Sakit Umum Daerah	Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional: Accepted/ Published	Prosiding dalam Pertemuan Ilmiah Internasional: Sudah Terbit/ Sudah Dilaksanakan Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Terakreditasi: Accepted/ Published Buku Hasil Penelitian: Sudah Terbit	Baru	199.675.000
4	1. Dr. Arie Utarlani, dr., SpAn., KAP. 2. Bambang Pujo Semedi, dr., SpAn., KIC 3. Agustina Salinding, dr., SpAn., KIC	8808130017 0008027306 8832800016	FK	Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT)	KEPATUHAN DAN OUTCOME PENATALAKSANAAN PASIEN SEPSIS DAN SYOK SEPSIS BERDASARKAN SSC (SURVIVING SEPSIS CAMPAIGN) 2016 DI RUANG RESUSITASI DAN INTENSIF RSUD DR SOETOMO	Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional: Accepted/ Published	Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional: Accepted/ Published	Lanjutan	110.000.000



PROTEKSI ISI PROPOSAL

Dilarang menyalin, menyimpan, memperbanyak sebagian atau seluruh isi proposal ini dalam bentuk apapun kecuali oleh pengusul dan pengelola administrasi penelitian

PROPOSAL PENELITIAN 2018

ID Proposal: 559ab884-2dc9-4fef-9c40-5912d3e333ae
Rencana Pelaksanaan Penelitian: tahun 2019 s.d. tahun 2019

1. JUDUL PENELITIAN

ESTIMASI UMUR MELALUI METHILASI DNA PADA SAMPEL PEMERIKSAAN DARAH

Bidang Fokus RIRN / Bidang Unggulan Perguruan Tinggi	Tema	Topik (jika ada)	Rumpun Bidang Ilmu
Kesehatan dan Obat	Teknologi alat kesehatan dan diagnostik	Pengembangan in vivo diagnostic (IVD) untuk deteksi penyakit degenerative	Kedokteran Forensik

Kategori (Kompetitif Nasional/ Desentralisasi/ Penugasan)	Skema Penelitian	Strata (Dasar/ Terapan/ Pengembangan)	SBK (Dasar, Terapan, Pengembangan)	Target Akhir TKT	Lama Penelitian (Tahun)
Penelitian Kompetitif Nasional	Penelitian Tesis Magister	SBK Riset Dasar	SBK Riset Dasar	3	1

2. IDENTITAS PENGUSUL

Nama, Peran	Perguruan Tinggi/ Institusi	Program Studi/ Bagian	Bidang Tugas	ID Sinta	H-Index
AHMAD YUDIANTO Ketua Pengusul	Universitas Airlangga	Ilmu Forensik		5986352	0
Dr MASNIARI NOVITA M.Kes Dosen Pembimbing Anggota 1	Universitas Jember	Pendidikan Dokter Gigi	Analisis pemeriksaan laboratorium	6017855	0
dr. Muhammad Afiful Jauhani Mahasiswa Bimbingan 2	Departemen Kedokteran Forensik dan Studi Medikolegal, Fakultas Kedokteran, Universitas	-	melakukan collecting sampling	0	0

	Airlangga				
Deka Bagus Binarsa, dr Mahasiswa Bimbingan 1	Ilmu Kedokteran Forensik dan Studi Medikolegal	-	melakukan collecting sampling	0	0

3. MITRA KERJASAMA PENELITIAN (JIKA ADA)

Pelaksanaan penelitian dapat melibatkan mitra kerjasama, yaitu mitra kerjasama dalam melaksanakan penelitian, mitra sebagai calon pengguna hasil penelitian, atau mitra investor

Mitra	Nama Mitra
-------	------------

4. LUARAN DAN TARGET CAPAIAN

Luaran Wajib

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (<i>accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i>)	Keterangan (<i>url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya</i>)
1	Prosiding dalam pertemuan ilmiah Internasional	sudah terbit/sudah dilaksanakan	National conference forensic medicine and science
1	Prosiding dalam pertemuan ilmiah Internasional	sudah terbit/sudah dilaksanakan	National conference forensic medicine and science

Luaran Tambahan

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (<i>accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i>)	Keterangan (<i>url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya</i>)
1	Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Terakreditasi	accepted/published	Folia Medica Indonesiana

5. ANGGARAN

Rencana anggaran biaya PPM mengacu pada PMK yang berlaku dengan besaran minimum dan maksimum sebagaimana diatur pada buku Panduan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Edisi 12.

Total RAB 1 Tahun Rp. 58,250,000

Tahun 1 Total Rp. 58,250,000

Jenis Pembelanjaan	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
HONOR	Honor sukarelawan	orang	10.00	200,000	2,000,000
HONOR	Honor teknisi laboratorium	orang	2.00	1,500,000	3,000,000
BELANJA BARANG NON OPERASIONAL LAINNYA	Publikasi	Jenis	2.00	3,000,000	6,000,000
BELANJA BARANG NON OPERASIONAL LAINNYA	Biaya pemeriksaan sekuensing	sampel	10.00	650,000	6,500,000
BELANJA BARANG NON OPERASIONAL LAINNYA	Sewa alat PCR	jam	60.00	40,000	2,400,000
BELANJA BARANG NON OPERASIONAL LAINNYA	Sewa alat eletrophorese	sampel	10.00	40,000	400,000

Jenis Pembelanjaan	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
BELANJA BARANG NON OPERASIONAL LAINNYA	Sewa sentrifusi	sampel	10.00	40,000	400,000
BELANJA BARANG NON OPERASIONAL LAINNYA	Pelaporan	eksemplar	5.00	200,000	1,000,000
BELANJA BARANG NON OPERASIONAL LAINNYA	Seminar Hasil	orang	20.00	30,000	600,000
BELANJA BAHAN	Agarose	botol	1.00	350,000	350,000
BELANJA BAHAN	Acrylamid	botol	2.00	300,000	600,000
BELANJA BAHAN	PCR mix	buah	2.00	3,000,000	6,000,000
BELANJA BAHAN	DNAzol	botol	1.00	3,500,000	3,500,000
BELANJA BAHAN	Primer (CSF1PO, TPOX TH01, vWA dan mtDNA)	pasang	5.00	1,750,000	8,750,000
BELANJA BAHAN	PCR Microtube	buah	100.00	40,000	4,000,000
BELANJA BAHAN	Micropipet	buah	100.00	30,000	3,000,000
BELANJA BAHAN	Loading marker	buah	1.00	1,750,000	1,750,000
BELANJA BAHAN	Reagen Bisulfit	botol	1.00	3,000,000	3,000,000
BELANJA PERJALANAN LAINNYA	Pengiriman sample sequencing	sample	10.00	500,000	5,000,000

Ringkasan penelitian tidak lebih dari 500 kata yang berisi latar belakang penelitian, tujuan dan tahapan metode penelitian, luaran yang ditargetkan, serta uraian TKT penelitian yang diusulkan.

RINGKASAN

Perkiraan umur sangat penting dalam analisis forensik. Umur individu lebih sering diperkirakan dengan menggunakan tulang dan gigi. Akan tetapi, hal ini terbatas hanya pada kasus-kasus tertentu yang berhubungan dengan adanya kerangka manusia. Belum tersedia metode yang paten dalam memperkirakan umur melalui DNA. Metilasi DNA merupakan salah satu cara dalam memperkirakan umur pada sampel biologis. Metilasi DNA merupakan cara modifikasi epigenetik yang terbaik dalam memperkirakan umur pada sampel biologis pada manusia. Hal ini dikarenakan, DNA pada individu yang mengalami penuaan menyerupai perkembangan yang diatur dalam proses yang dikontrol ketat oleh modifikasi epigenetik khusus. Proses modifikasi replikasi ini hanya ditemukan pada posisi 5 cincin pirimidin dari sitosin dalam urutan CpG dinukleotida. (Yi et al., 2014; Tost, 2009).

Pada penelitian ini bertujuan untuk dapat memperkirakan umur dari hasil isolasi DNA dengan menggunakan metilasi DNA pada sampel darah. Khususnya, Mengetahui penggunaan metilasi DNA dari sampel darah dalam memperkirakan umur individu. Mengetahui urutan DNA dari hasil metilasi DNA pada sampel urine dan menganalisis hubungan persen metilasi dengan umur individu dari sampel urine.

Jenis penelitian ini adalah deskriptif dengan jumlah sampel sebanyak 10 sampel dengan variasi umur yang berbeda di setiap jenis kelaminnya. Tahapan-tahapan pada penelitian ini dimulai dari pengambilan sampel darah yang dipastikan sehat, di preparasi kemudian di isolasi dengan menggunakan DNAzol dan kloroform. Hasil isolasi kemudian di konversi bisulfit dan di PCR. Hasil PCR kemudian di sekuensing, sebelum disekuensing hasil PCR di elektroforesis agar diketahui panjang band yang akan disekuensing. Hasil sekuensing dianalisis dengan aplikasi online dan kemudian dihitung persen metilasinya. Hasil persen metilasi kemudian di uji statistik regresi linier dengan menggunakan program SPSS untuk mengetahui nilai validasinya.

Kata kunci maksimal 5 kata

Perkiraan umur; Metilasi DNA; Konversi; Bisulfit; Sekuensing.

Latar belakang penelitian tidak lebih dari 500 kata yang berisi latar belakang dan permasalahan yang akan diteliti, tujuan khusus, dan urgensi penelitian. Pada bagian ini perlu dijelaskan uraian tentang spesifikasi khusus terkait dengan skema.

LATAR BELAKANG

Ilmu forensik adalah ilmu yang mempelajari tentang tindak kejahatan yang membantu penegak hukum dan peradilan. Ilmu ini sangat penting dalam menganalisis barang bukti yang ditemukan, salah satunya adalah analisis DNA pada sampel yang ditemukan di dalam Tempat Kejadian Perkara (TKP). DNA (Deoxyribose Nukleic Acid) adalah asam nukleotida yang memiliki urutan basa nukleotida yang berbeda disetiap individu, kecuali kembar identik satu sel telur. Sampel DNA dapat diperoleh dari mana saja. Selain darah, DNA dapat juga dianalisis di sampel lainnya salah satunya pada sampel urine (Agudelo et al, 2016).

Perkiraan umur sangat penting dalam analisis forensik. Umur individu lebih sering diperkirakan dengan menggunakan tulang dan gigi. Akan tetapi, hal ini terbatas hanya pada kasus-kasus tertentu yang berhubungan dengan adanya kerangka manusia. Oleh karena itu diperlukan metode lainnya dalam memperkirakan umur pada sampel biologis. Belum tersedia metode yang paten dalam memperkirakan umur melalui DNA. Metilasi DNA merupakan salah satu cara dalam memperkirakan umur pada sampel biologis (Alisch et al, 2014).

Metilasi DNA merupakan cara modifikasi epigenetik yang terbaik dalam memperkirakan umur pada sampel biologis pada manusia. Hal ini dikarenakan, DNA pada individu yang mengalami penuaan menyerupai perkembangan yang diatur dalam proses yang dikontrol ketat oleh modifikasi epigenetik khusus. Proses modifikasi replikasi ini hanya ditemukan pada posisi 5 cincin pirimidin dari sitosin dalam urutan CpG dinukleotida. 5-Methylcytosine dari beberapa puncak CpG dalam DNA genomik dapat direplikasi selama pembelahan sel dengan pemeliharaan DNA methyltransferases (DNMT) tertentu sebagai mediasi pada DNA tersebut (Bekaert et al, 2015).

Tinjauan pustaka tidak lebih dari 1000 kata dengan mengemukakan *state of the art* dan peta jalan (*road map*) dalam bidang yang diteliti. Bagan dan *road map* dibuat dalam bentuk JPG/PNG yang kemudian disisipkan dalam isian ini. Sumber pustaka/referensi primer yang relevan dan dengan mengutamakan hasil penelitian pada jurnal ilmiah dan/atau paten yang terkini. Disarankan penggunaan sumber pustaka 10 tahun terakhir.

TINJAUAN PUSTAKA

I. TEKNOLOGI PROFILING DNA METILASI

Banyak teknologi dapat digunakan untuk deteksi dan analisis metilasi DNA. Mereka dapat dibagi menjadi tiga subkelompok utama sesuai dengan pretreatment DNA sebelum analisis: (a) digesti enzim (menggunakan restriction endonuclease); (b) pengayaan afinitas (menggunakan antibodi atau protein pengikat metil yang spesifik untuk situs CpG termetilasi); dan (c) konversi natrium bisulfit. Dalam ulasan ini kami membatasi diskusi kami untuk pretreatment ketiga karena hampir semua teknologi analisis-termilasi yang relevan dengan tes forensik, dari penemuan marker usia untuk menguji implementasi, menggunakan konversi bisulfit.

A. Konversi Bisulfit

Konversi bisulfit ditemukan pada 1990-an dan mewakili terobosan untuk deteksi dan analisis metilasi DNA [27,45]. DNA genomik yang terdenaturasi (ssDNA) diberi perlakuan dengan sodium bisulfit yang mendeaminasi residu sitosin yang tidak termetilasi ke urasil. Setelah PCR, urasil diamplifikasi sebagai timin, sementara residu 5-methylcytosine diamplifikasi sebagai sitosin. Reaksi kimia ini menyebabkan degradasi DNA yang besar dan karena itu, pemurnian berikutnya diperlukan untuk menghilangkan natrium bisulfit. Protokol rinci telah dijelaskan di tempat lain. Selain itu, beberapa perangkat komersial saat ini tersedia untuk melanjutkan perawatan ini. Jumlah input DNA yang disarankan oleh produsen, meskipun variabel dan tergantung pada teknologi berikutnya diterapkan, lebih tinggi daripada untuk mengetik STR. Rata-rata 200–500 ng DNA input biasanya digunakan untuk mengkompensasi degradasi yang dihasilkan natrium bisulfit dalam DNA. Saat ini, beberapa laboratorium secara internal menguji bahan masukan kecil dan oleh karena itu, pengoptimalan selanjutnya dari protokol dapat mengurangi kuantitas DNA yang digunakan.

Metode berbasis te-Bisulfit menyediakan resolusi pasangan tunggal dan data kuantitatif yang akurat. Oleh karena itu, sebagian besar data metilasi DNA baru didasarkan pada metodologi ini. Langkah konversi kemudian diikuti oleh amplifikasi DNA dengan target-spesifik c spesifik.

Sumber bias dapat menjadi konversi bisulfit yang tidak lengkap; Namun, ini dapat diatasi dengan analisis paralel dari kontrol metilasi DNA atau cytosines non-CpG internal yang diubah untuk mengukur keberhasilan reaksi konversi. Diferensial PCR efisiensi untuk termetilasi versus bagian-bagian yang tidak termetilasi dari sekuens identik juga dapat memperkenalkan beberapa bias.

Perlu juga dicatat bahwa bisulfiteconversion tidak dapat membedakan antara 5-methylcytosine (5-mC) dan 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC). Nukleotida 5-hmC baru-baru ini menerima banyak perhatian setelah pendeteksiannya dalam tingkat tinggi di Purkinje neuron dan sel induk embrio [80], serta penemuan simultan dari sekelompok enzim yang mengkatalisis hidroksilasi 5-mC menjadi 5-hmC. (Misalnya, Okase oksigen Ten-Eleven-Translokasi atau TETs). Akibatnya, ini telah memperkenalkan residu baru dalam genom, yang perannya dalam regulasi gen masih perlu dijelaskan. Meskipun 5-hmC berada di luar ruang lingkup tinjauan ini, penting untuk diingat bahwa studi masa depan akan fokus pada mengartikan fungsi biologisnya.

Protokol baru yang dapat mendeteksi 5-hmC telah dioptimalkan lebih lanjut dan akhirnya akan diketahui apakah perubahan usia-progresif dalam tingkat residu ini juga dapat berkontribusi pada estimasi usia. Proporsi metilasi DNA di situs CpG tertentu disebut nilai β -metilasi. Nilai ini dinilai dengan mengambil rasio sinyal methylated (C) ke unmethylated (T). Fraksi adalah $M / (M + U)$, di mana M merupakan sinyal untuk molekul termetilasi dan U sinyal untuk molekul unmethylated. Metilasi DNA diukur pada skala 0 hingga 1 (atau 0 hingga 100%). Nilai $\beta=0$ menunjukkan tidak adanya metilasi lengkap, sementara 1 menunjukkan metilasi penuh di situs CpG yang diteliti. Karena metilasi DNA diukur sebagai rata-rata dari kumpulan sel dan karena perubahan progresif dialami dalam sel-sel ini selama masa hidup individu, distribusi bimodal untuk nilai β tidak terlihat pada penanda yang terkait usia, tetapi nilai-nilai bertahap antara 0 dan 1 .

B. Ukuran Genom yang Bisa Dijangkau

Penemuan Umur yang Cocok - Informatif Metilasi Lokasi Whole-genom bisulfite sequencing (WGBS) dan penggunaan analisis DNA berbasis array seperti Illumina Infinium

HumanMethylation array adalah teknologi yang memungkinkan pemindaian genomewide pola metilasi DNA. WGBS menggabungkan bisulfite treatment DNA skala besar dengan sekuens throughput tinggi untuk menghasilkan apa yang dikenal sebagai "methylome". Sebuah methylome menyediakan peta lengkap pola metilasi semua sitosin di genom suatu organisme atau sel. Keuntungan utama dari metode ini adalah cakupan CpG penuh (~ 28 juta situs CpG dalam genom manusia) termasuk situs non-CpG atau CpH (H = A, C, T), semuanya terdeteksi pada resolusi nukleotida tunggal. Dalam konteks penelitian penuaan manusia, WGBS diterapkan di tempat pertama untuk mengeksplorasi methylomes dari bayi yang baru lahir dan centenarians, dan mendeteksi hipomethylation terkait usia yang dominan global. Data yang diperoleh dari WGBS tidak bias dan akurat mencerminkan lanskap methylome dari genom, karena seluruh urutan dipetakan.

Namun, kelemahan utama untuk cakupan genomewide penuh adalah biaya studi mahal yang mencakup ukuran sampel yang besar. Selanjutnya, memproses dan mengelola jumlah data yang dihasilkan adalah waktu dan memerlukan alat komputasi khusus. Target bisulfite sequencing berasal dari WGBS sebagai metode yang mengurangi biaya dengan pengambilan selektif dari sebagian kecil dari sitosin. Karena sebagian besar genom terkuras habis dari CpG, banyak studi cakupan penuh tidak memiliki informasi yang relevan; oleh karena itu, mencakup bagian spesifik dari genom dapat menyebabkan retrieval variasi epigenetik yang lebih informatif. Sebagai alternatif untuk sekuensing, array Infinium BeadChip dibuat (Illumina, CA, USA). Analisis

berbasis Array menggunakan natrium bisulfite conversion DNA dan resolusi single-base berikutnya dari situs CpG yang ditargetkan menggunakan probe capture gratis untuk urutan kepentingan dan disusun pada microarray [90]. Rangkaian berbasis chip hemat biaya dan waktu analisis secara substansial berkurang. Human Methylation 27K BeadChip (HM27) diperkenalkan pada tahun 2008 dan menginterogasi lebih dari 27.000 situs CpG. Array ini digantikan pada tahun 2011 oleh HumanMethylation450K BeadChip (HM450) yang terdiri lebih dari 450.000 penanda CpG.

Cakupan yang ditingkatkan dari chip ini menyediakan alat yang dapat diterapkan secara luas dan menjadi platform pilihan untuk banyak studi asosiasi epigenome (kode akses: GPL13534 dalam kumpulan data GEO online di NCBI). Namun, satu kekurangan dari chip HM450 adalah hanya sekitar 1,5% dari keseluruhan CG gen diwakili pada chip dan pemilihan situs bias terhadap promotor dan kepulauan CpG. Situs CpG di elemen regulasi distal - yaitu, enhancer - sangat kurang terwakili. Untuk mengimbangi ini, microarray Illumina yang diperbarui baru-baru ini telah dirilis: MethylationEPIC BeadChip. Array EPIC ini mencakup 853.307 situs CpG dan berisi > 90% dari situs 450K, tetapi menambahkan 333.265 CpG yang terletak di kawasan regulasi. Sebagian besar dari situs tambahan ini terletak di daerah penambah (urutan yang berdampak transkripsi sementara berbaring distal ke situs awal transkripsi yang terletak di wilayah konten CPG miskin) dan array juga berguna untuk mendeteksi 5-hydroxymethylcytosine. Namun, proporsi elemen regulasi masih terbatas dan comethylation dari beberapa situs dalam wilayah kecil tidak dapat diasumsikan dari probe CpG tunggal per elemen. Ketika data dari studi WGBS dan HM450 / EPIC secara langsung dibandingkan, tingkat metilasi yang diperoleh dari kedua platform umumnya sesuai dan berkorelasi baik. Sedangkan WGBS menemukan sebagian besar situs hypomethylated dengan usia; ini dapat dipertanggungjawabkan oleh bias masing-masing metode menunjukkan ke arah wilayah tertentu dalam genom. Selain itu, teknologi alternatif yang mencakup metilom skala besar (misalnya, pengayaan afinitas) juga konsisten dengan pola hipometilasi situs CpG dengan penuaan. Ketika langsung membandingkan pola metilasi yang diperoleh dari metode pengayaan afinitas di pulau-pulau CpG, hypermethylation adalah lazim, menunjukkan konkordansi antara teknologi ketika menargetkan situs serupa. Singkatnya, teknologi genomwide mencakup sejumlah besar situs CpG di seluruh genom. Meskipun mereka tidak dapat dikelola secara forensik pada skala ini, analisis bioinformatik data dari studi kunci, yang dapat diakses dari database publik, dapat dianalisis untuk menemukan korelasi antara pola metilasi yang diberikan dan usia donor yang tercatat pada saat penelitian. Ini memberikan langkah penemuan yang berharga untuk mengidentifikasi penanda penanda usia yang informatif tanpa perlu studi skala besar.

C. Intermediate Coverage: Validasi

Terlepas dari Pyrosequencing, dua metode utama deteksi metilasi yang berlaku untuk validasi penanda metilasi DNA dari penggunaan potensial untuk estimasi usia. Ini adalah sistem EpiTYPER® berbasis spektrometri massa (Agena Bioscience) dan sequencing massively parallel (MPS, alternatif sequencing generasi atau NGS). Cakupan yang mereka tawarkan adalah menengah, yaitu, ratusan hingga ribuan situs CpG dapat dideteksi secara bersamaan dengan setiap sistem. The Agena Bioscience EpiTYPER® sistem (San Diego, CA, USA; sebelumnya Sequenom) adalah metode berbasis pengobatan bisulfit digabungkan dengan spektrometri massa MALDI-TOF. Tingkat metilasi dikenali sebagai set CpG, yang terdiri dari satu, atau beberapa posisi CpG dalam fragmen DNA yang sama (diperoleh dengan pembelahan dasar-spesifik dari DNA dengan enzim spesifik). Oleh karena itu, beberapa posisi CpG dalam satu set dapat

dideteksi ketika mereka diposisikan secara dekat. Pedoman protokol rinci dapat ditemukan di Suchiman et al. Teknologi ini menargetkan wilayah genom sekitar 200-600 nt panjangnya, memiliki otomatisasi tingkat tinggi dan sangat berguna untuk mengukur sejumlah besar sampel atau wilayah dalam satu analisis. Studi tentang wilayah kandidat atau validasi penanda yang diperoleh dari data cakupan genomwide sebelumnya layak dan relatif terjangkau dengan sistem EpiTYPER®. Replikasi teknis antara EpiTYPER® dan Infinium BeadChip array menunjukkan reproduktifitas antara kedua sistem. Karena keunggulan ini, komunitas forensik telah menunjukkan minat dalam mengembangkan metode prediksi usia berdasarkan data yang dihasilkan dengan teknologi EpiTYPER®.

Meskipun resolusi singlenucleotide dapat dicapai, beberapa CpGs sangat dekat satu sama lain dideteksi sebagai blok dan jika analisis individu diperlukan, teknik tambahan harus diterapkan. Platform MPS dilindungi oleh teknologi sekuens throughput tinggi. Ada beberapa metode untuk MPS dan kemudian, kemampuan sekuensing mereka bervariasi sesuai dengan metodologi yang dipilih. Sedangkan WGBS bertujuan untuk menangkap seluruh genom dari sampel, teknologi alternatif MPS dikembangkan untuk menargetkan daerah spesifik genom ukuran yang diperkecil (misalnya, amplicon bisulfite sequencing). Platform MPS disesuaikan dengan analisis DNA forensik dan dirancang untuk digunakan sebagai teknologi throughput tinggi yang mendapatkan peningkatan traksi.

Dua pemasok utama, Illumina (menggunakan detektor MiSeq) dan Thermo Fisher (menggunakan detektor Ion Torrent-based dari Ion PGM dan Ion S5), menawarkan sistem deteksi urutan kompak di mana penanda dianalisis dengan skala besar sequencing paralel dari beberapa fragmen pendek di workflow otomatis. Kedua sistem mengurutkan DNA *in-situ* dan mengkonversi bisulfite untuk mendeteksi daerah DNA metilasi yang ditargetkan. Teknologi MiSeq menggunakan sekuensing-oleh-sintesis: di mana terminator reversibel berlabel fluorescently dicitrakan sebagai setiap dNTP ditambahkan, dan kemudian dibelah untuk memungkinkan penggabungan basis berikutnya. Ion Torrent MPS kimia didasarkan pada sekuensing semikonduktor: setiap kali nukleotida dimasukkan ke untai DNA yang tumbuh, sebuah proton dilepaskan dan variasi dalam pH diukur. Kedua metode memberikan panjang pembacaan urutan maksimum serupa (sekitar 300-400 nt) dan harus dicatat bahwa teknologi yang mendasari untuk MiSeq menawarkan deteksi perenggangan homopolimer yang sedikit lebih baik. Deteksi sinyal oleh sistem Ion Torrent dilakukan secara real time dan oleh karena itu waktu operasi yang sesuai lebih pendek dari MiSeq, di mana deteksi sinyal dilakukan oleh pencitraan. Namun, lebih banyak waktu diperlukan untuk persiapan sampel menggunakan teknologi Ion Torrent. Kedua metode, meskipun awalnya diluncurkan untuk genotipe SNP, mampu menganalisis metilasi DNA, meskipun aplikasi ini relatif baru dan optimalisasi protokol masih diperlukan. Salah satu keuntungan utama dari pendekatan MPS yang ditargetkan adalah jumlah minimal input DNA.

Meskipun masih terlalu dini untuk menetapkan perbandingan teknis dengan sistem sebelumnya, beberapa pekerjaan awal yang mengeksplorasi data MPS versus data Illumina BeadChip telah dilaporkan untuk memberikan tingkat reproduktifitas yang tinggi. Selain itu, perbandingan langsung antara data DNA metilasi dari penanda yang berkaitan dengan usia antara MiSeq dan Ion PGM menunjukkan bahwa meskipun cakupan untuk MiSeq sangat meningkat, nilai metilasi dari kedua platform dapat direplikasi (David Ballard, Kings College: London, Inggris; komunikasi pribadi). Selanjutnya, pendekatan awal untuk memprediksi usia individu berdasarkan sistem MiSeq MPS baru-baru ini dilaporkan. Platform MPS adalah bagian dari tinjauan ini dalam kategori validasi, tetapi mereka menjanjikan teknologi untuk implementasi forensik penuh dalam waktu yang tidak terlalu jauh. Meskipun pengoptimalan dan konsensus

lebih lanjut dalam komunitas forensik pada penanda yang sesuai masih diperlukan, banyak pekerjaan pembangunan sedang berlangsung. D. Cakupan Rendah: Implementasi Forensik Setelah dipilih dan divalidasi, penanda forensik perlu diimplementasikan dalam teknik yang dapat menangani DNA khas jejak biologis forensik: sering terdiri dari DNA berkualitas rendah dan / atau tingkat rendah.

Untuk mengimplementasikan analisis lokasi DNA metilasi lokus-spesifik, pyrosequencing telah disarankan sebagai "standar emas". Namun, ia memiliki beberapa keterbatasan yang sebagian besar diatasi oleh single-base-extension (SBE). Pyrosequencing ditemukan oleh Pål Nyrén pada tahun 1987. Saat ini, metode ini telah digambarkan sebagai teknologi sequencing-by-synthesis yang sangat kuantitatif. Pyrosequencing memanfaatkan produksi cahaya setelah rilis pirofosfat (luminescence), ketika nukleotida dimasukkan ke untai DNA yang tumbuh, dalam sistem kaskade enzimatik. DNA input adalah bisulfit-treated. Untuk deskripsi teknis lengkap, lihat Tost and Gut. Replikasi teknis antara pyrosequencing dan Infinium BeadChip array telah dilaporkan memiliki reproduktifitas tinggi, serta dengan EpiTYPER®.

Dalam konteks forensik, pyrosequencing adalah metode pilihan untuk implementasi model prediksi usia awal. Meskipun panjang bacaan untuk pyrosequencing relatif pendek (kurang dari 100 nt), itu tidak dianggap sebagai kerugian untuk implementasi forensik, karena penanda pilihan biasanya situs CpG tunggal. Namun, pyrosequencing tidak berfungsi dengan baik ketika multiplexing, meskipun beberapa upaya untuk mencapai ini telah dilakukan. Reaksi multiplex PCR jelas diinginkan ketika beberapa penanda yang terletak di daerah genom yang berbeda ditargetkan dalam tes yang bertujuan untuk menganalisa sampel dengan DNA tingkat rendah. Untuk mengatasi masalah ini, perluasan satu basis dapat diterapkan. SBE (disebut juga sequencing-mini) terdiri dari annealing oligonukleotida tanpa label yang cocok dengan urutan yang berbatasan langsung dengan situs yang ditargetkan.

Penggabungan berikutnya dari terminator fluorescently pelabelan tunggal tunggal (ddNTP) menghasilkan untai urutan diperpanjang oleh satu nukleotida. SBE telah banyak digunakan dalam genetika forensik untuk SNP genotyping menggunakan SNaPshot® assay. Dengan penambahan pengobatan bisulfit ke protokol, metilasi DNA dapat dengan mudah dideteksi menggunakan kimia yang sama. Keuntungan utama yang ditawarkan SBE adalah kapasitasnya untuk multiplexing, yang memungkinkan deteksi simultan dari beberapa situs CpG dalam satu reaksi tunggal. Sebuah studi awal menggunakan teknik ini untuk estimasi usia dalam sperma baru-baru ini telah dilaporkan. Meskipun tingkat metilasi DNA menggunakan SNaPshot® adalah hasil kuantitatif, perhatian khusus diperlukan ketika menilai sinyal fluoresensi, karena tidak semua fluorofora menampilkan intensitas yang sama. Oleh karena itu, direkomendasikan bahwa analisis dibatasi sebanyak mungkin untuk kombinasi nukleotida C / T (pewarna kuning / merah) daripada kombinasi G / A (biru / hijau), karena sinyal C dan T memiliki intensitas fluoresensi yang paling mirip. sehingga rasio puncak puncak C / T selalu lebih seimbang. Meskipun nilai-nilai DNA metilasi yang diperoleh oleh SBE yang awalnya dibandingkan dengan teknologi Infinium BeadChip memberikan korelasi tinggi [84], studi replikasi sangat dianjurkan untuk menetapkan konsistensi antara kedua teknik dan pendekatan yang dikembangkan oleh laboratorium yang berbeda.

II. FORENSIC AGE ESTIMATION USING DNA METHYLATION TESTS

Studi metilasi DNA secara spesifik untuk estimasi usia forensik terus bertambah dalam lima tahun terakhir. Beberapa model prediksi usia telah dikembangkan menggunakan gen yang tumpang tindih sebagian, seperti yang dijelaskan di bawah ini. Sekarang saatnya bagi komunitas forensik untuk mencapai konsensus di situs-situs CpG yang paling informatif mengenai usia yang mencakup kebutuhan untuk menganalisa berbagai jaringan, populasi, rentang usia, dan teknologi deteksi, dengan tujuan akhir dari sistem prediksi usia universal.

A. Current Forensic Age-Prediction Models

Sampai saat ini, beberapa model prediksi usia yang berlaku untuk analisis DNA forensik telah dikembangkan berdasarkan berbagai gen, jaringan, dan teknologi. Ini dirangkum dalam Tabel 2. Aplikasi pertama metilasi DNA untuk estimasi usia menggunakan sejumlah situs CpG diskrit adalah Weidner et al. pada tahun 2014. Penelitian mereka menggunakan model 3-CpG yang terdiri dari satu situs CpG yang terletak di tiga wilayah genom independen. Dengan cara ini, tiga situs diidentifikasi sebagai: cg02228185 (ASPA), cg25809905 (ITGA2B), dan situs CpG dekat dengan cg17861230 (PDE4C), digunakan untuk membangun model prediksi usia dari DNA sampel darah.

Meskipun cg17861230 awalnya adalah target analisis, deteksi simultan dari situs CpG yang diposisikan secara dekat oleh pyrosequencing mengarah ke deteksi situs CpG lain 14 nt terpisah, dengan hubungan yang lebih baik dengan usia. Dengan demikian, akurasi prediksi ± 5.43 tahun dilaporkan untuk model 3-CpG yang dikembangkan yang kemudian diadaptasi ke sampel swab buccal (dijelaskan secara rinci dalam bagian II.C), dengan menggunakan penanda dan teknologi identik, dan memperoleh akurasi yang sama. Bahkan penggunaan tunggal penanda PDE4C dalam sampel bukal diusulkan untuk cukup informatif untuk mencapai prediksi usia yang dapat diandalkan.

Namun, pada saat tinjauan ini, eksplorasi lebih rinci dari model CpG tunggal ini diperlukan. Gen tunggal untuk estimasi usia juga diselidiki oleh Zbiec-Piekarska et al., berfokus pada tingkat metilasi DNA ELOVL2 dalam sampel darah menggunakan pyrosequencing. Dalam penelitian ini, korelasi kuat dengan usia ditemukan untuk dua situs CpG di wilayah promotor ELOVL2. Namun, peningkatan lebih lanjut dari penanda tambahan disarankan untuk meningkatkan model prediksi usia yang disarankan. Dengan mempertimbangkan hal ini, penelitian pertama ditindaklanjuti dengan model prediksi usia yang diperbarui menggunakan situs-situs CpG (ELOVL2, C1orf132, TRIM59, KLF14, dan FHL2).

Akurasi yang disediakan oleh model ini meningkatkan hasil sebelumnya dengan mencapai nilai prediktif deviasi absolut (MAD) median $\pm 3,40$ tahun. Akses terbuka untuk penggunaan khusus model prediksi usia dari penelitian ini dapat ditemukan di:

<http://www.agecalculator.ies.krakow.pl/>. Sekali lagi, deteksi simultan dengan pyrosequencing situs CpG diposisikan memungkinkan penemuan penanda tambahan yang bahkan lebih erat terkait dengan usia dari situs CpG target asli. Karena korelasi yang tinggi dengan usia yang ditunjukkan oleh situs ELOVL2 CpG, gen ini telah dimasukkan dalam semua sistem prediksi usia forensik selanjutnya. Park et al. [116] melaporkan model berbasis darah menggunakan tingkat metilasi DNA dari tiga situs CpG di ZNF423, ELOVL2, dan CCDC102B (MAD: ± 3.16 tahun). CCDC102B sudah diidentifikasi oleh Zbiec-Piekarska dkk. sebagai gen yang sangat informatif, meskipun tidak termasuk dalam model akhir studi tersebut. Bersamaan dengan studi Park et al., Zubakov et al. termasuk ELOVL2, FHL2, DUSP27, dan ORAOV1 dalam model berbasis darah 8-CpG yang melaporkan MAD: ± 5.09 tahun. Dalam studi ketiga yang diselesaikan pada saat yang sama oleh Giuliani et al., baik ELOVL2 dan FHL2 ditambah PENK

dibawa bersama-sama dalam sistem prediksi usia menggunakan sampel gigi. Jumlah penanda yang digunakan dalam model Giuliani et al. Bervariasi antara 5-13 situs CpG, tergantung pada luas gigi yang dinilai.

Menariknya, gen paling informatif ELOVL2 tidak termasuk dalam model prediksi usia awal yang dikonstruksi oleh Lee et al. menggunakan sampel semen [84]. Jaringan yang digunakan sebagai sumber DNA untuk pengembangan tes dan untuk membangun model prediktif adalah faktor kunci. Seperti dijelaskan di bawah ini, peristiwa metilasi DNA terjadi di sel germinal yang kemudian mengikuti jalur yang berbeda tergantung pada langkah diferensiasi jaringan.

Independen dari situs atau jaringan CpG dievaluasi, karakteristik umum dari semua sistem prediksi statistik yang dikembangkan dalam tes forensik adalah penggunaan model regresi linier multivariat. Regresi linear adalah pendekatan untuk memodelkan hubungan antara variabel interogasi (dalam hal ini, usia kronologis) dan satu atau lebih variabel yang diamati (yaitu, tingkat metilasi DNA dari satu atau beberapa situs CpG). Selain itu, penting untuk dicatat bahwa data untuk model regresi linier perlu memenuhi beberapa asumsi yang mendasari tentang data: (a) tidak adanya collinearity; (B) tidak adanya heteroskedastisitas; dan (c) adanya normalitas. Dari ketiganya, kehadiran collinearity dapat diterima jika prediksi dibuat dari kombinasi variabel prediktor yang sama yang berasal dari "data pelatihan" yang digunakan untuk membangun model.

Namun, jika normalitas tidak ada dan / atau heteroskedastisitas hadir, penggunaan model linier sederhana menjadi terbatas. Meskipun kehadiran heteroskedastisitas belum secara langsung dilaporkan dalam salah satu model prediksi studi di atas, itu tercermin dengan tidak adanya keseragaman dalam kesalahan prediksi. Itu berarti, meskipun MAD yang terkait per model adalah nilai tunggal yang mengukur kesalahan dalam semua prediksi; dalam kenyataannya, kesalahan prediksi secara proporsional meningkat seiring dengan usia seseorang. Sebagian besar penelitian sebelumnya menangani efek ini dengan membagi usia subjek studi yang spesifik ke dalam kelompok diskrit yang sesuai dengan rentang usia. Ketika ini dilakukan, kesalahan prediksi yang ditunjukkan oleh subjek muda selalu di bawah individu lansia. Bekaert dkk. secara langsung menunjukkan bagaimana kesalahan prediksi sudah berumur; penelitian mereka membagi kelompok sampel menjadi empat kategori rentang usia 20 tahun. Prediktor usia yang dikembangkan oleh Bekaert et al. dibangun menggunakan DNA tingkat metilasi sampel darah di empat situs CpG di ASPA, PDE4C, ELOVL2, dan EDARADD gen. Gen EDARADD juga telah dipilih oleh Weidner et al., dan diidentifikasi dalam studi awal Freire-Aradas et al., sebagai gen ageprediksi informatif. Namun, masalah teknis menghalangi penggunaan penanda ini. Perlu juga dicatat bahwa dalam model yang dikembangkan oleh Bekaert et al., Data yang berasal dari ELOVL2 diperlakukan secara statistik berbeda dari gen lain yang digunakan. Sebuah model regresi kuadrat diadopsi untuk ELOVL2, di mana tingkat metilasi gen dikuadratkan untuk memaksimalkan akurasi dalam hasil (MAD: $\pm 3,75$ tahun).

Meskipun sebagian besar situs CpG yang dipilih umumnya menunjukkan korelasi linear dengan usia kronologis, ELOVL2 tidak, dan dengan demikian model kuadrat disarankan sebagai cara untuk meningkatkan prediksi. Pengamatan serupa bahwa korelasi antara kadar metilasi DNA dan usia tidak selalu dijelaskan oleh regresi linier sederhana juga disorot oleh studi Xu et al.

Penelitian ini mengembangkan model prediksi usia menggunakan enam situs CpG dari gen: ADAR, AQP11, ITGA2B, dan PDE4C. Meskipun regresi kuadrat awalnya diuji, hasil yang paling akurat diperoleh dengan asumsi model regresi vektor dukungan. Penggunaan alternatif analisis regresi untuk model linier juga diterapkan dalam sistem prediksi usia yang dikembangkan oleh Freire-Aradas et al. Prediktor usia ini didasarkan pada total tujuh situs CpG

yang terletak di tujuh wilayah genom: ELOVL2, ASPA, PDE4C, FHL2, CCDC102B, C1orf132, dan chr16: 85395429 (tidak ada gen yang terkait dengan posisi terakhir).

Studi tentang Freire-Aradas memperoleh kesalahan prediksi rata-rata $\pm 3,07$ tahun. Model ini dikembangkan menggunakan sampel darah DNA dari satu set pelatihan besar yang terdiri lebih dari 700 orang, yang didistribusikan secara seragam baik di usia dan jenis kelamin. Kehadiran heteroskedastisitas diamati dalam data, sehingga analisis regresi kuantilisasi multivariat diterapkan sebagai model prediksi yang paling tepat untuk data. Keuntungan utama menggunakan regresi kuantil daripada regresi linier sederhana adalah bahwa mantan menetapkan interval prediksi spesifik-usia setiap kali data baru berkontribusi pada model. Sementara interval tunggal ditampilkan dalam regresi linier, interval prediksi dalam model regresi kuantil relatif dan spesifik usia. Akses gratis ke alat prediktor usia online yang sesuai yang dikembangkan oleh Freire-Aradas et al. dapat ditemukan di situs web klasifikasi Klasifikasi forensik di: <http://mathgene.usc.es/cgi-bin/snps/processmethylation.cgi>. Terakhir, laporan terbaru dari Vidaki et al. memperkenalkan penggunaan jaringan saraf artifi cial dan menunjukkan perbaikan konsisten atas regresi linier. Model prediksi usia yang dikembangkan untuk penelitian ini menghitung 16 situs CpG dan memberikan nilai MAD $\pm 7,45$ tahun.

Singkatnya, dalam waktu hanya dua sampai tiga tahun, sejumlah besar prediktor usia forensik telah dikembangkan, terutama berdasarkan pada sampel darah, tetapi dengan jumlah yang semakin meningkat sekarang yang meliputi jaringan tambahan. Secara independen dari teknologi deteksi metilasi yang digunakan atau analisis statistik yang diterapkan, kesamaan dalam akurasi prediksi secara konsisten dilaporkan. Tren ini menegaskan temuan yang jelas bahwa deteksi kadar metilasi DNA mengarah ke model prediksi usia yang sangat akurat. Meskipun tingkat presisi yang lebih tinggi yang diinginkan, itu lebih penting pada saat ini, di mana laboratorium telah menyelesaikan penemuan gen kandidat mereka, untuk mencapai konsensus mengenai situs CpG yang harus digabungkan ke dalam panel metilasi yang disetujui sebelum ini disesuaikan untuk MPS- analisis berdasarkan.

B. Candidate Genes

Dalam pencarian gen kandidat metilasi, data dominan yang dilaporkan dalam domain publik berasal dari Infinium BeadChip array. Terutama yang relevan adalah Illumina HM450, karena cakupannya yang tinggi dari situs metilasi dan digunakan dalam kebanyakan studi ekspresi gen manusia. Untuk menangkap gen paling informatif usia yang dijelaskan di bawah ini, kriteria yang diterapkan adalah: (a) tingkat metilasi DNA yang dilaporkan menunjukkan korelasi dengan usia; (b) identifikasi ganda sebagai penanda dalam model prediksi usia forensik saat ini; dan (c) kehadiran dalam data metilasi yang berasal dari studi HM450. Kompilasi gen kandidat dalam susunan HM450 memungkinkan situs metilasi mereka untuk siap diteliti baik dalam studi yang ada dan yang baru selesai.

Data ekspresi manusia yang paling komprehensif menggunakan HM450 chip adalah GSE87571, dirilis pada akhir tahun 2016, dan data ini telah digunakan dalam kajian untuk menghasilkan gambaran baru untuk menunjukkan pola yang diperoleh dengan gen kandidat yang paling terkait usia. Ringkasan karakteristik gen dan situs CpG mereka yang digunakan untuk menggambarkan korelasi usia dikompilasi dalam Tabel 3. Perlu dicatat bahwa daerah lain dalam genom yang tidak tercakup oleh rangkaian Infinium BeadChip saat ini dapat memberikan banyak tambahan yang terkait usia Situs CpG sama atau lebih informatif daripada yang dijelaskan saat ini. Bagian atas daftar gen kandidat utama untuk prediksi usia dipimpin oleh ELOVL2 (ELOVL fatty acid elongase 2). Korelasi usia kronologis dengan tingkat metilasi DNA dalam promotor ELOVL2

mencapai nilai tertinggi dan secara konsisten diidentifikasi sebagai prediktor terbaik dalam berbagai penelitian. Gen ini milik keluarga gen ELOVL (perpanjangan-dari-rantai-asam-lemak), yaitu, kumpulan enzim protein elongase yang memiliki peran dalam metabolisme lipid manusia dari pengendalian perpanjangan asam lemak.

Sampai saat ini, tujuh enzim ELOVL telah dijelaskan (ELOVL # 1–7) dan semuanya ditutupi oleh HM450 yang menganalisa lebih dari 100 situs CpG. Dari tujuh gen perpanjangan asam lemak, ELOVL2 menonjol sebagai prediktor usia terbaik. ELOVL2 terletak di kromosom 6 (kira-kira 6: 10980500 hingga 6: 11046600, koordinat GRCh37) dan mengkode enzim transmembran retikulum endoplasma yang secara spesifik terlibat dalam pemanjangan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA). Selama penuaan, promotor ELOVL2 menjadi hipermetilasi. Lima belas situs CpG di ELOVL2 ditangkap oleh HM450, di antaranya telah berada di wilayah promotor (cg16323298, cg16867657, cg21572722, cg24724428, dan cg25151806). Dari posisi promotor CpG ini, cg16867657, cg21572722, dan cg24724428 memberikan korelasi tingkat metilasi tertinggi dengan usia (koefisien korelasi Spearman, rs: 0,9522, 0,9121, dan 0,8857, masing-masing). Diagram dispersi terkait untuk situs-situs ini ditunjukkan pada Gambar 1A. Namun, hipermetilasi DNA sedikit meningkat dengan cg16323298 (rs: 0,4704) dan pola konstan diamati untuk cg25151806 (rs: 0,1250).

Jarak meningkat untuk cg16323298 (sekitar 80 nt) dan cg25151806 (> 400 nt). Karena korelasi usia yang tinggi dan berkurangnya intervariabilitas yang ditampilkan oleh situs CpG di wilayah genom ini, sistem prediksi usia forensik yang paling informatif yang dikembangkan sejauh ini semuanya telah menyertakan penanda ELOVL2 dalam model mereka. Deskripsi gen yang telah diadopsi secara luas - ASPA, EDARADD, FHL2, ITGA2B, dan PDE4C - yang merupakan tambahan untuk ELOVL2 mengikuti urutan abjad. Gen ASPA (aspartoacylase, atau bernama: SPATA22) terletak di kromosom 17 (17: 3375500– 3406600), dan memainkan peran dalam katabolisme protein dan peptida. Ini mengkodekan enzim spesifik mengkatalisis konversi N-asetil-L-aspartat (NAA) menjadi aspartat dan asetat. ASPA ditutupi oleh HM450 dengan 10 situs CpG, dari mana cg02228185 adalah yang paling terkenal, karena telah dimasukkan dalam beberapa model prediksi usia forensik. Plot-plot ini menunjukkan kedua CpG berkorelasi negatif dengan usia, dan meskipun lebih banyak dispersi diamati pada usia yang lebih tua, ASPA β-nilai lebih terdistribusi secara merata pada orang dewasa muda.

Gen EDARADD (domain kematian terkait EDAR) terletak pada kromosom 1 (1: 236511600– 236647900). Protein yang sesuai ditemukan untuk berinteraksi dengan EDAR, reseptor domain kematian yang terlibat dalam evolusi morfologi, karena diperlukan untuk perkembangan rambut, gigi, dan jaringan ektodermal lainnya. Korelasi usia pada awalnya dilaporkan oleh Bocklandt et al. [17], terutama informatif untuk situs EDARADD CpG cg09809672, dan kemudian dieksplorasi sebagai penanda forensik. Sebanyak 21 situs CpG yang terkait dengan EDARADD termasuk dalam HM450, dari ini; cg09809672 (rs: -0.8182) bersama dengan cg18964582 (rs: -0.7271) adalah CpG yang paling terkait usia dari gen ini

Gen FHL2 (empat setengah LIM domain 2) terletak di kromosom 2 (2: 105974256-106054900) dan mengkode protein domain LIM. Domain LIM adalah domain interaksi protein yang mengatur proliferasi sel, apoptosis, dan ekspresi gen. Protein FHL2 diduga memiliki peran dalam perakitan membran ekstraseluler. HM450 menargetkan 34 situs CpG dalam gen ini dan dari ini, cg06639320 (rs: 0.9362), cg22454769 (rs: 0.9339) dan cg24079702 (rs: 0.8999) telah berulang kali dilaporkan sebagai posisi yang sangat berkorelasi usia. Gambar 1D menunjukkan peningkatan hipermetilasi terjadi pada FHL2, dengan akumulasi progresif kelompok metil.

Gen ITGA2B (integrin subunit alpha 2b) terletak di kromosom 17 (17: 42449400-42468400). Gen ini memainkan peran kunci dalam sistem pembekuan darah, dengan memediasi agregasi trombosit. Dua puluh dua CpG dari ITGA2B dilindungi oleh HM450. Meskipun gen ini telah dimasukkan dalam beberapa model prediksi usia forensik, korelasi dengan usia adalah tingkat rendah, seperti yang dapat diamati pada Gambar 1E. Situs cg00062245 (rs: 0,6427) dan cg25809905 (rs: -0,5247) adalah satu-satunya posisi CpG di mana sedikit pola hiper atau hipometilasi dengan usia telah ditemukan. Namun, eksplorasi lebih lanjut dari gen ini bisa menambah lebih banyak detail tentang kegunaan ITGA2B untuk estimasi usia dalam situasi tambahan, termasuk jaringan yang berbeda untuk darah atau rentang usia ekstrem. Selain itu, penting untuk dicatat bahwa koeksistensi pola hiper dan hipometilasi yang saling berkorelasi secara bersamaan yang masing-masing berkorelasi dengan usia untuk gen yang sama, sangat jarang. Namun demikian, perlu juga dicatat bahwa kedua situs CpG terpisah cukup jauh (lebih dari 5000 nt). Oleh karena itu mereka terletak di daerah yang berbeda dari gen yang sama dan kemudian, kedua situs bisa menjadi bagian dari mekanisme penuaan yang cukup berbeda.

Gen PDE4C (phosphodiesterase 4C) terletak pada kromosom 19 (19: 18318900–18360800) dan mengkode protein yang mengatur konsentrasi seluler cAMP, mediator tanggapan sel terhadap sinyal ekstraseluler. Dari semua gen yang dijelaskan dalam ulasan ini, PDE4C menyajikan cakupan tertinggi oleh HM450 (total situs 45 CpG). Gambar 1F menunjukkan bahwa situs CpG yang paling terkait usia di PDE4C (cg17861230 dan cg20119148; rs: 0.7084 dan 0.7114, masing-masing) menunjukkan peningkatan tingkat metilasi dengan usia. Beberapa prediktor usia forensik telah memasukkan PDE4C dalam model mereka, tetapi dari penelitian ini perlu dicatat bahwa CpG yang ditemukan 14 nt terpisah dari cg17861230 yang umum digunakan telah terdeteksi sebagai yang paling berkorelasi dengan usia. Hal ini berkaitan dengan poin yang dibuat dalam pengenalan bagian ini, bahwa HM450 adalah platform kuat yang menghasilkan data dalam jumlah besar, namun informasi tambahan yang diperoleh dari teknologi alternatif seringkali dapat memberikan situs CpG yang lebih informatif.

Singkatnya, gen singkat yang dirangkum di sini adalah lokus kandidat yang baik yang telah dipelajari secara luas untuk pengembangan tes estimasi usia forensik, karena tingkat korelasi yang tinggi antara pola metilasi DNA dan usia kronologis. Ini telah tercermin dalam adopsi yang konsisten mereka sebagai komponen kunci dari banyak model prediktor usia yang telah dilaporkan oleh komunitas forensik.

C. Intertissue Variability

Metilasi DNA juga dikenal sebagai cara yang informatif untuk mengidentifikasi cairan tubuh atau sumber jaringan jejak forensik. Pola metilasi DNA biasanya jaringan / tipe-sel-spesifik dan properti ini dapat digunakan dalam skenario forensik untuk memastikan sumber biologis dari banyak jejak DNA. Karena karakteristik ini, tantangan dalam tes penuaan yang masih membutuhkan eksplorasi lebih lanjut adalah untuk sepenuhnya mengevaluasi variabilitas intertissue tingkat metilasi DNA; karena dapat menjadi kasus bahwa prediktor utama dalam satu jenis jaringan, seperti darah, tidak memiliki variasi yang diperlukan dalam jaringan lain, atau tidak memiliki hubungan yang cukup dekat dengan usia. Masalah ini awalnya ditangani oleh prediktor usia multitissue yang dikembangkan oleh Horvath. Data DNA metilasi dari lebih dari 50 jaringan dan tipe sel yang berasal dari penelitian berdasarkan HM27 / MH450 dieksplorasi dalam. Dari analisis ini, kumpulan 353 situs CpG dipilih untuk membangun sistem prediksi yang dapat diterapkan secara seragam ke jaringan yang berbeda (MAD: $\pm 3,6$ tahun).

Jaringan yang relevan secara forensik yang diperiksa oleh Horvath termasuk darah, air liur, dan air mani. Dari data tersebut, perkiraan usia epigenetik yang lebih rendah diperoleh untuk air mani dibandingkan dengan bagian lain dari tubuh manusia. Hasil serupa ditemukan oleh Lee et al. dan akibatnya prediktor usia spesifik untuk air mani diusulkan. Karena contoh air mani adalah sel germinal, pemeliharaan pola epigenetik dapat diatur oleh jalur biologis yang berbeda dengan yang bekerja pada sel somatik. Secara independen, untuk memiliki prediktor usia universal yang dapat diterapkan secara bersamaan untuk sampel darah atau air liur akan menguntungkan untuk tes forensik. Namun demikian, jumlah situs CpG yang diperlukan untuk tes membuat tes umum menjadi berat. Untuk alasan ini, Jam epigenetik Horvath, yang diadaptasi dalam berbagai penelitian, adalah tes forensik yang tidak efektif pada usia ketika spesimen DNA berkualitas buruk / kuantitas dianalisis. Agar dapat diterapkan pada sampel forensik, sejumlah penanda yang berkurang harus dikompilasi, dan batasan ini pada jumlah posisi KPG yang dianalisis menyebabkan kurangnya universalitas jaringan dalam pengujian. Seperti yang dijelaskan sebelumnya, Weidner et al. mengembangkan model prediksi usia berdasarkan data DNA metilasi darah dari jumlah terbatas hanya tiga situs CpG (dalam gen: ASPA, ITGA2B, dan PDE4C). Plot perkiraan dan usia kronologis yang diamati menunjukkan akurasi yang tinggi dalam analisis sampel darah (MAD: $\pm 5,43$ tahun). Dua tahun kemudian, kinerja model 3-CpG ini diuji dalam sampel swab bukal. Hasil menunjukkan korelasi yang tinggi antara prediksi dan usia kronologis (R^2 : 0:91).

Namun, data dari sampel buccal / saliva menyebabkan usia rata-rata 14,6 tahun di atas nilai mereka yang sebenarnya. Karena ini adalah overestimasi yang konsisten daripada efek acak, langkah pelatihan ulang untuk model sebelumnya diadopsi dan model 3-CpG kemudian dilaporkan (MAD: ± 4.3 tahun). Selanjutnya, Eipel et al. menguji set data tambahan secara lebih rinci yang berasal dari darah, air liur, dan penyeka bukal dan korelasi rendah metilasi DNA dengan usia ditemukan untuk dua situs PPG yang termasuk dalam model: cg02228185 (ASPA) dan cg25809905 (ITGA2B). Sebaliknya, cg17861230 (PDE4C) menghasilkan korelasi yang lebih kuat dengan usia dalam air liur dan penyeka bukal daripada dalam darah. Ini menyoroti kebutuhan untuk evaluasi penuh pola metilasi dalam berbagai jenis jaringan dan adaptasi model prediksi dasar yang digunakan dalam pengembangan uji awal dari suatu jaringan tertentu, karena perbedaan selalu muncul. Dapat dikatakan bahwa pengamatan ini bertentangan dengan model Horvath; Meskipun demikian, efek spesifik jaringan dapat dikompensasi sebagian dengan menggunakan penanda terkait usia yang lebih tinggi.

Penilaian paralel jaringan juga dibahas oleh penelitian Bekaert et al. Dalam penelitian ini, model prediktor usia-forensik dikembangkan berdasarkan kadar metilasi DNA darah yang diperoleh dari empat gen (ASPA, PDE4C, ELOVL2, dan EDARADD), dan kemudian diuji pada sampel dentin. Prediksi kesalahan sedikit meningkat (MAD: $\pm 4,84$ di gigi versus $\pm 3,75$ dalam darah) dan oleh karena itu, untuk meningkatkan akurasi prediksi keseluruhan dari tes, pencarian rinci penanda terkait usia gigi-spesifik dibuat. Perlu dicatat bahwa batasan ukuran sampel mungkin telah memengaruhi hasil. Sampel gigi kemudian dieksplorasi lebih detail oleh Giuliani et al. Penelitian ini menguji gigi modern untuk pola dalam tiga gen terkait usia ELOVL2, FHL2, dan PENK, yang sebelumnya dilaporkan untuk darah. Meskipun batasan ukuran sampel juga diterapkan pada data penelitian ini, hasil awal menunjukkan tingkat metilasi DNA serupa pada gigi yang diamati dalam darah dan kemudian menghasilkan prediksi yang akurat (MAD: $\pm 1,20$ - $7,07$ tahun tergantung pada area gigi yang dianalisis).

Analisis gigi dan tulang layak mendapat perhatian khusus, karena tulang-tulang kerangka merupakan sumber DNA yang paling melimpah untuk antropolog forensik. Karena sedikitnya

data yang telah dilaporkan untuk uji usia epigenetik untuk jaringan ini, penyelidikan tambahan baik pada sampel DNA modern atau kuno diperlukan untuk mengetahui apakah model prediksi yang serupa dapat diterapkan pada sampel-sampel historis. Penanganan DNA purba lebih menantang, karena proses deaminasi secara alami terjadi sejak saat kematian, yaitu sitosin termetilasi cenderung membusuk menjadi thymines sementara sitosin nonmethylated cenderung membusuk ke uracils, dari waktu ke waktu dalam sampel postmortem. Sebagaimana dinyatakan oleh Pedersen et al: "informasi epigenetik tersedia dari organisme kontemporer, tetapi sulit untuk melacak kembali dalam waktu evolusi". Perlambatan atau percepatan jam epigenetik pada situs CpG yang berbeda karena variasi evolusioner dalam diet atau lingkungan manusia dapat secara berbeda berdampak pada populasi kuno dan kontemporer serta pola metilasi mereka. Terlepas dari keterbatasan ini, pertanyaan awal dieksplorasi dari sampel batang rambut dari Paleo-Eskimo berusia 4.000 tahun milik budaya Saqqaq; di mana analisis dua situs CpG (TRIM58 dan KCNQ1DN) dari DNA yang terisolasi mengarah ke perkiraan usia antara 44,1 dan 69,3 tahun. Meskipun hasil ini perlu dinilai dengan hati-hati, mereka mungkin dianggap sebagai prompt untuk menyelidiki jaringan tambahan yang akan lebih berguna dalam antropologi dan juga sebagai bukti yang sering ditemukan dalam skenario forensik. Bloodstains juga merupakan bentuk bukti umum dalam kasus kriminal dan beberapa penelitian telah mengkonfirmasi stabilitas metilasi DNA dalam spesimen tersebut. Tidak ada perbedaan statistik antara usia yang diprediksi menggunakan darah dan noda darah ditemukan oleh Huang et al.

Selain itu, prediksi usia untuk noda darah lama yang disimpan hingga empat bulan pada kondisi ruangan dipastikan dengan benar. Periode waktu yang lebih panjang dieksplorasi oleh Zbiec-Piekarska dkk., misalnya, untuk noda darah disimpan pada suhu kamar selama 5, 10, dan 15 tahun. Meskipun dengan waktu konsentrasi DNA semakin menurun di noda darah tersebut, berlawanan dengan status degradasi sampel, yang secara bertahap meningkat; sampel-sampel yang dapat diperkuat, dihasilkan sama tingkat prediksi usia yang benar secara independen ke waktu penyimpanan, mengkonfirmasi stabilitas pola metilasi DNA.

Selain pengujian untuk variasi DNA metilasi potensial antara jaringan, potensi variasi intratis dalam pengaruh komposisi tipe sel juga telah disarankan menjadi faktor penting. Darah utuh adalah kumpulan beragam jenis sel, menampilkan profil metilasi DNA yang berbeda, yang distribusi dan proporsinya tergantung pada usia. Untuk alasan ini, komposisi seluler telah dianggap sebagai faktor pembaur yang telah diusulkan harus diperhitungkan dalam model prediksi usia. Namun demikian, efek komposisi seluler darah dieksplorasi oleh Weidner et al. di bawah model 3-CpG dan tidak ada asosiasi yang jelas dengan tipe sel yang ditemukan. Temuan ini sesuai dengan jam epigenetik Horvath yang hanya menemukan perbedaan kecil di sel darah yang diurutkan. Komposisi tipe sel juga dapat memiliki peran dalam spesimen tambahan seperti penyeka bukal - yaitu, campuran heterogen sel epitel bukal dan leukosit. Untuk meningkatkan hasil estimasi usia dari sumber-sumber biologis ini, dua situs CpG spesifik-jenis sel (CD6 dan SERPINB5) dimasukkan dalam model dari Eipel et al. menyesuaikan prediksi untuk distribusi seluler, meskipun akurasi prediksi hanya sedikit meningkat.

Karena pada saat ini beberapa model prediksi usia yang akurat telah dikembangkan, validasi intertissue sebagai studi tindak lanjut langkah demi langkah diperlukan untuk setiap model. Mungkin hasil ideal dari tes metilasi multitissue forensik yang unik bukanlah hasil yang realistis. Dalam hal ini, model independen harus diperbaiki, terutama untuk jaringan yang belum sepenuhnya dipelajari sejauh ini, tetapi sering ditemukan dalam analisis forensik atau antropologis, termasuk air mani, rambut, gigi, atau tulang.

D. Intergroup Variability

Variasi potensial dalam usia epigenetik yang dapat dikaitkan dengan karakteristik individu yang berbeda yang tidak terkait dengan usia juga harus dinilai secara penuh. Untuk memastikan konsistensi dan ketahanan uji forensik, penting untuk mengevaluasi variasi yang dapat dilihat dengan membagi individu ke dalam kelompok berdasarkan: (a) jenis kelamin, (b) leluhur, dan (c) terjadinya penyakit dalam jangka hidup individu. Seks sebagai variabel yang dapat mempengaruhi pola metilasi DNA telah dipelajari secara luas. Namun, hasil yang kontradiktif telah dilaporkan. Beberapa penelitian mendeteksi pola metilasi DNA berkorelasi seksual sementara yang lain tidak menemukan asosiasi yang signifikan. Dari pengamatan yang membingungkan seperti itu dapat menjadi kasus bahwa meskipun pola metilasi dari beberapa situs CpG berpotensi dipengaruhi oleh perubahan hormonal yang secara langsung terkait dengan seks, posisi-posisi KPG yang ditargetkan untuk estimasi usia bisa netral terhadap efek ini, dan dengan demikian tidak memiliki asosiasi semacam itu. Prediktor usia forensik yang dikembangkan sejauh ini juga memberikan hasil yang berbeda. Sedangkan Bekaert dkk. dan Freire-Aradas et al. gagal mendeteksi efek seks apa pun, Weidner et al. dan Zbiec-Piekarska dkk. menemukan sedikit kontribusi dari parameter ini terhadap tingkat penuaan.

Populasi berbeda yang berasal dari daerah yang tersebar luas di dunia terpapar berbagai faktor lingkungan, termasuk diet bervariasi, tingkat radiasi UV atau paparan polusi udara, dan lain-lain. Karena lingkungan secara langsung terkait dengan epigenetika, bisa jadi kasus bahwa pola metilasi DNA yang berbeda ditemukan di situs-situs CpG yang sama, ketika nenek moyang yang berbeda diperiksa. Sebagian besar studi yang dilakukan pada estimasi usia sejauh ini didasarkan pada populasi Eropa. Dengan demikian, perlu untuk mengeksplorasi seluruh kelompok populasi di seluruh dunia untuk memastikan apakah prediktor usia umum dapat diterapkan secara independen dari populasi asal; atau jika penyesuaian khusus penduduk diperlukan untuk model prediksi yang digunakan.

Variasi metilasi DNA di populasi manusia awalnya dieksplorasi di Eropa (CEU) versus Afrika (YRI) HapMap individu; dengan perbedaan terbukti di ratusan situs CpG. Dalam penelitian berikutnya, bahkan lebih banyak variasi ditandai dalam pola metilasi DNA yang diamati di tiga populasi global (Kaukasia-Amerika, Afrika-Amerika, dan Han Cina-Amerika). Namun, penting untuk dicatat bahwa dari lebih dari 400 situs CpG yang bermetastasis diferensial yang dilaporkan, tidak ada yang cocok dengan gen kandidat usia yang berkorelasi yang sudah dijelaskan. Namun, penelitian tambahan harus dilakukan untuk memastikan hasil ini. Jam epigenetik Horvath baru-baru ini dinilai dalam lima kelompok populasi yang berbeda (Afrika, Kaukasia, Hispanik, Asia Timur, dan Tsimane Amerindian). Meskipun variasi dalam prediksi usia epigenetik terdeteksi pada leluhur yang berbeda, dataset yang lebih besar harus dipelajari untuk menyeimbangkan ukuran sampel dari setiap kelompok populasi yang dianalisis. Independen dari hasil ini, penting untuk dicatat bahwa gen prediktor usia utama ELOVL2 juga diidentifikasi dalam penelitian Asia, serta CCDC102B juga termasuk dalam model prediksi usia yang dikembangkan oleh Freire-Aradas et al. Investigasi Asia tambahan juga memasukkan ITGA2B dan PDE4C ke dalam model prediksi usia mereka, yang sebelumnya dilaporkan oleh Weidner et al. Ini membuka pintu untuk aplikasi penanda penanda usia prediktif forensik umum di seluruh dunia.

Kehadiran penyakit telah dikaitkan dengan pola metilasi DNA yang diubah. Kanker pada manusia menonjol sebagai peristiwa kehidupan paling penting yang mempengaruhi perubahan epigenetik grosir. Bahkan, pola metilasi DNA telah dianggap sebagai tanda kanker; ketika pola DNA hipometilasi genomewide, serta hipermetilasi DNA di pulau-pulau CpG terkait promotor hadir dalam tumor dibandingkan dengan rekan-rekan jaringan yang sehat. Efek yang disebabkan

kanker seperti itu dapat meniru tanda-tanda epigenetik penuaan alami. Relevan untuk model prediksi usia saat ini, terutama yang dikembangkan dari sampel darah, adalah penentuan kadar metilasi DNA yang terdeteksi dalam jaringan yang dipengaruhi oleh kehadiran tumor di berbagai organ manusia selain darah. Bukti menunjukkan bahwa perubahan metilasi DNA dalam darah mungkin mewakili kejadian awal dalam perkembangan kanker atau hasil yang berhubungan dengan kesehatan, seperti penyakit kardiovaskular. Oleh karena itu, kehati-hatian harus dilakukan, dan adopsi interval prediksi usia yang terkait dengan usia tertentu dapat membantu mengurangi prediksi yang salah, sambil mempertahankan informasi yang bermakna.

CONCLUDING REMARKS

Estimasi usia forensik telah mendapat perhatian cukup besar dalam tiga hingga empat tahun terakhir. Korelasi tingkat metilasi DNA dengan usia kronologis telah menjadi langkah kunci dalam meningkatkan akurasi prediksi dari tes tersebut dan perkembangannya dipercepat untuk penggunaan forensik. Penelitian terperinci tentang tingkat metilasi CpG mendasari pencapaian besar dalam mengembangkan tes ini, yang didasarkan pada contoh pertama, pada analisis DNA dari sampel darah. Bloodstains membentuk bagian penting dari bukti forensik dalam banyak kasus kejahatan, tetapi sebagai tambahan, bukti sering terdiri dari rambut atau air mani dan jejak air liur. Untuk alasan ini, pemeriksaan rinci lebih lanjut dari jaringan-jaringan ini diperlukan. Demikian pula, gigi dan tulang juga memerlukan penelitian untuk mengembangkan tes yang berguna untuk studi antropologi bahan skeletal. Masalah tambahan juga perlu pemeriksaan lebih lanjut, termasuk perpanjangan studi pola-metilasi di luar subyek Eropa dan analisis rinci peristiwa kehidupan dan pengaruhnya pada tingkat metilasi terkait usia di antara individu-individu yang sebaliknya sebanding dalam semua faktor lainnya. Banyak laboratorium forensik di seluruh dunia sekarang memaksimalkan upaya mereka untuk memvalidasi berbagai model yang diterbitkan dan set situs CpG yang paling informatif. Dengan meningkatnya kecepatan dan ruang lingkup pekerjaan ini, posisi konsensus pada pemilihan optimal situs PTG dan sistem analisis DNA yang paling sesuai dapat diharapkan dalam waktu dekat.

Metode atau cara untuk mencapai tujuan yang telah ditetapkan ditulis tidak melebihi 600 kata. Bagian ini dilengkapi dengan diagram alir penelitian yang menggambarkan apa yang sudah dilaksanakan dan yang akan dikerjakan selama waktu yang diusulkan. Format diagram alir dapat berupa file JPG/PNG. Bagan penelitian harus dibuat secara utuh dengan penahapan yang jelas, mulai dari awal bagaimana proses dan luarannya, dan indikator capaian yang ditargetkan. Di bagian ini harus juga mengisi tugas masing-masing anggota pengusul sesuai tahapan penelitian yang diusulkan.

METODE

Jenis Penelitian

Jenis penelitian pada penelitian ini adalah deskriptif.

Sampel Penelitian

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah darah dari beberapa pendonor sehat di daerah Surabaya. Penentuan sampel ini digunakan. Penarikan sampel tidak secara acak (*non probability sampling*). Teknik *sampling* yang digunakan adalah *sampling purposive*. *Sampling*

purposive merupakan teknik penentuan sampel dengan pertimbangan tertentu. Sampel yang digunakan akan disesuaikan dengan kriteria tertentu yang diterapkan berdasarkan tujuan penelitian.

Berdasarkan penjelasan dari teknik tersebut, maka digunakan sampel sebanyak 10 Sampel dengan rentang usia yang digunakan dari umur 1 tahun hingga 65 tahun dengan rincian seperti berikut (Depkes, 2009):

Balita	: 0-5 Tahun pada laki-laki dan perempuan
Kanak-Kanak	: 5-11 Tahun pada laki-laki dan perempuan
Remaja	: 12-25 Tahun pada laki-laki dan perempuan
Dewasa	: 26-45 Tahun pada laki-laki dan perempuan
Lansia	: 46-65 Tahun pada laki-laki dan perempuan

Alat dan Bahan Penelitian

Alat

Tabung Falcon 50 mL, tabung Falcon 15 mL, tabung Eppendorf 1,5 mL, tabung Eppendorf 500 μ L, Chem Bath, Water bath, mikropipet Eppendorf, *freezer*, alat sentrifugasi, *thermal cycler*, *vortex*, Spindown, seperangkat alat elektroforesis, *Applied Biosystems 3130 XL Genetic Analyzers* dan UV transiluminator.

Bahan

Kit DNA Metilasi *EZ DNA Methylation-DirectTM* dari *Zymo Research*, etanol 90%, etanol 70%, *Destilated Water*, DNA Marker 1 kb, primer *T7 promotor tag*, primer *10 mer tag*, kit *HotStarTaq Plus Master Mix* dari *Qiagen*, agarosa, bufer TAE (Tris-asetat 40 mM dan Na₂EDTA 1 mM pH 8), EtBr, dan T7 primer, kontrol positif K562, DNAZOL, kloroform, isopropanol,

Pengambilan sampel

Sampel darah yang akan digunakan didapatkan dari pendonor berdasarkan persetujuan kode etik yang diterapkan dan persetujuan dari pihak pendonor. Darah sebanyak ± 5 mL yang didapatkan dari pendonor adalah darah vena yang diambil dari vena cubiti.

Preparasi Sampel

Sampel darah yang didapatkan dari beberapa pendonor di preparasi dengan cara sebanyak 3 mL sampel darah ditempatkan pada tabung 3 mL. setelah itu, sampel yang berada di tabung di sentrifugasi dengan kecepatan 6000 x g selama 20 menit pada suhu -20°C . Hasil sentrifugasi akan terbentuk supernatan dan pelet. Supernatan dibuang dan pelet digunakan pada tahapan selanjutnya yaitu tahapan isolasi metilasi DNA.

Tabel 4.2. Reagen-reagen dalam kit *EZ DNA Methylation-DirectTM* (Zymo Research Corp.,CA)(Zymo, 2014).

Kit <i>EZ DNA Methylation-DirectTM</i>	D5020	Temperatur Penyimpanan
<i>Proteinase K dan Storage Buffer</i>	5 mg set	-20°C (setelah dicampur)
<i>M-Digestion Buffer (2x)</i>	4 mL	Suhu ruangan
<i>CT Conversion Reagen</i>	5 tabung	Suhu ruangan
<i>M-Dilution Buffer</i>	1,5 mL	Suhu ruangan
<i>M-Solubilization Buffer</i>	4,5 mL	Suhu ruangan
<i>M-Reaction Buffer</i>	1 mL	Suhu ruangan
<i>M-Binding Buffer</i>	30 mL	Suhu ruangan
<i>M-Wash Buffer</i>	6 mL	Suhu ruangan
<i>M-Desulphonation Buffer</i>	10 mL	Suhu ruangan
<i>M-Elution Buffer</i>	1 mL	Suhu ruangan
<i>Zymo-SpinTM IC Columns</i>	50 kolom	Suhu ruangan
Tabung penyimpan	50 Tabung	Suhu ruangan
Petunjuk penggunaan	1	-

Persiapan reagen

Sampel darah di isolasi dengan menggunakan kit DNA Metilasi dari *EZ DNA Methylation-DirectTM* (Zymo Research Corp.,CA). Satu kit terdapat beberapa bahan yang digunakan, dapat dilihat pada Tabel 4.2. Sebanyak 790 μ L *M-Solubilization Buffer* dan 300 μ L *M-Dilution Buffer* ditambahkan di setiap tabung *CT Conversion Reagen*, dan dicampur sebanyak 160 μ L *M-Reaction Buffer*. Etanol 90% ditambahkan 24mL ke 6mL *M-Wash Buffer* konsentrat sebelum digunakan (Zymo, 2014).

Isolasi metilasi DNA

Isolasi dilakukan dengan menggunakan DNAZOL Kloroform. Sampel yang berada di tabung Falcon ditambahkan sebanyak 1000 μ L DNAZOL kemudian divortex dan diinkubasi selama satu jam. Setelah itu, sampel ditambahkan kembali sebanyak 200 μ L Kloroform, vortex dan diinkubasi selama satu malam. Sampel hasil inkubasi semalam kemudian di sentrifugasi pada kecepatan 6000 x g selama 20 menit pada suhu -20°C. hasil sentrifugasi terbentuk 3 lapisan lapisan paling bawah berwarna merah, lapisan tengah berwarna kekuningan dan lapisan paling atas berwarna jernih. Lapisan paling atas diambil secara perlahan dan dipindahkan pada tabung eppendorf 1,5 mL (Sari, 2015).

Sampel yang sudah ada di dalam tabung eppendorf ditambahkan isopropanol sebanyak 500 μ L dan dibolak-balik secara perlahan. Sampel tersebut diinkubasi selama satu jam. Setelah itu, sampel di sentrifugasi selama 12000 x g selama 10 menit. Hasil sentrifugasi akan membentuk supernatan dan pelet, supernatan di buang dan pelet di cuci dengan menggunakan Etanol 70 % dan didiamkan selama satu jam. Setelah di diamkan satu jam, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000 x g selama 10 menit. Pelet hasil sentrifugasi ditambahkan *Destilated Water* sebanyak 50 μ L sedangkan supernatannya di buang (Sari, 2015).

Konversi Bisulfit akan digunakan metode yang diinstruksikan pada petunjuk penggunaan kit (2014). Sebanyak 50µL sampel DNA ditambahkan ke 130µL *CT Conversion Reagen* dalam Tabung PCR . Sampel dicampur dan kemudian disentrifugasi 5000 x g selama 1 menit, untuk memastikan tidak ada tetesan berada ditutup atau sisi tabung. Tabung- tabung PCR ditempatkan dalam *thermal cycler* dan melakukan langkah-langkah berikut:

1. Pada suhu 98°C selama 8 menit
2. Pada suhu 64°C selama 3,5 jam
3. Pada suhu 4°C dalam penyimpanan hingga 20 jam.

Sebanyak 600µL *M-Binding Buffer* dimasukan ke dalam *Zymo-spin*TM IC Kolom dan diletakkan kolom ke tempat yang disediakan. Sampel yang berada pada *Thermal Cycler* ditambahkan ke dalam *Zymo-spin*TM IC kolom, kemudian ditutup dan diaduk dengan membalik kolom beberapa kali. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 10000 x g selama 30 detik kemudian supernatan dibuang (Zymo, 2014).

Pelet yang dihasilkan dicuci dengan 100µL *M-Wash Buffer* ke dalam kolom. Kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 x g selama 30 detik. Setelah itu, supernatan kembali di buang, dan pelet ditambahkan 200µL *M-Desulphonation Buffer* ke dalam kolom dan di inkubasi pada suhu 20°C selama 20 menit. Setelah diinkubasi, disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 x g selama 30 detik (Zymo, 2014).

Supernatan dibuang dan *pellet* kemudian dicuci 2 kali dengan 200 µL *M-Wash Buffer* dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 x g selama 30 detik. Kolom ditempatkan ke dalam tabung 1,5ml *microcentrifuge*. Sebanyak 10µL *M-Elution Buffer* ditambahkan langsung ke matriks kolom. Sentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 x g selama 30 detik untuk mengelusi DNA (Zymo, 2014).

Hasil elusi DNA dapat di analisis langsung maupun di PCR. Untuk kontrol negatif digunakan Aquades dan untuk kontrol positif digunakan DNA *Marker*. Hasil dari isolasi metilasi DNA dilihat terlebih dahulu dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% (Zymo, 2014).

PCR amplifikasi

Primer yang digunakan pada proses PCR amplifikasi ini di gunakan *T7 Promotor tag* sebagai *reverse primer* dengan sekuens 5'-CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCT-3'. dan *10 mer tag* dengan sekuens 5'-AGGAAGAGAG-3' bertindak sebagai *forward primer*. Dalam melakukan PCR amplifikasi digunakan Kit *HotStarTaq Plus Master Mix* (Qiagen, USA). Reagen yang didapatkan dalam kit dapat dilihat pada Tabel 4.3, (Qiagen, 2010).

Langkah awal adalah mencampurkan 5 μ L Sampel DNA yang termetilasi dengan larutan Primer masing-masing sebanyak 1 μ L ke dalam tabung. Setelah itu, ditambahkan 10 μ L larutan *HotStarTaq Plus Master Mix*, 2X. Setelah dicampur, larutan ditambahkan dengan *Coral Load Concentrate* 10X sebanyak 2 μ L, kemudian ditambahkan dengan *RNAse-Free Water* sebanyak 1 μ L.

Tabel 4.3. Reagen yang didapatkan pada kit *HotStarTaq Plus Master Mix* (Qiagen, USA), (Qiagen, 2010).

<i>HotStarTaq plus Master Mix Kit</i>	Isi	250 Unit
<i>HotStarTaq plus Master Mix</i>	<i>HotStarTaq DNA Polymerase</i> , PCR <i>Buffer</i> dengan 3mM MgCl, 400 μ M Campuran dNTP	3 X 0,85 mL
<i>RNAse-Free Water</i>		2 X 1,7 mL
<i>Coral Load Concentrate, 10X</i>		1 X 0,55 mL
<i>Handbook</i>		1

Pada siklus optimasi dilakukan aktivasi pada *Thermal Cycler* dengan suhu 95°C selama 5 menit. Kemudian, masuk dalam 3 siklus yaitu: denaturasi, *annealing* dan ekstensi. Pada tahapan denaturasi dilakukan pada suhu 94°C selama 1 menit, lalu tahapan *annealing* pada suhu 65°C selama 1 menit dan tahapan ekstensi dilakukan pada suhu 72°C selama 1 menit (Qiagen, 2010; Ehrich *et al.*, 2006).

Siklus ini diulang sebanyak 30 siklus, setelah siklus selesai sampel di inkubasi pada suhu 72°C selama 10 menit. Setelah itu, dibiarkan semalaman pada suhu -20°C. Hal ini diperlakukan juga pada kontrol positif K562 dan kontrol negatif aquades. Hasil PCR dapat dilihat pada elektroforesis gel agarosa 1% (Qiagen, 2010; Ehrich *et al.*, 2006).

Elektroforesis gel agarosa

Tahapan ini dilakukan untuk mengetahui metilasi DNA hasil setelah PCR. Gel agarosa 1% yang digunakan untuk elektroforesis dibuat dengan melarutkan 0,4 g agarosa dalam 40 mL bufer TAE (Tris-asetat 40 mM dan Na₂EDTA 1 mM pH 8) dengan pemanasan. Setelah agarosa terlarut dan didinginkan sampai kira-kira suhunya 45°C, selanjutnya gel agarosa dituangkan pada cetakan dan dibiarkan memadat.

Elektroforesis dilakukan dalam bufer TAE pada tegangan 70-100 Volt. Elektroforesis dihentikan ketika telah bermigrasi kira-kira 2/3 dari panjang gel. Gel agarosa kemudian direndam dalam larutan EtBr 250 µg/mL selama 30 menit. Pita DNA dapat diamati dengan sinar UV menggunakan UV Transiluminator. Panjang metilasi DNA hasil isolasi sekitar 150-300 bp (Eryatma, 2012; Yi *et al.*, 2014).

Analisis kuantitatif terkait usia metilasi

Sampel produk dari PCR diperlukan sebanyak 20 µL untuk mengidentifikasi situs CpG dapat menggunakan *Applied Biosystems 3130 XL Genetic Analyzers* dalam mengukur status

metilasi terisolasi penanda metilasi terkait usia pada pendonor. Primer yang digunakan adalah T7 dengan urutan 5'-CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCT-3'. Hasil sekuensing dibaca dengan *Bioedit*[®] (Applied, 2005; Febria, 2012).

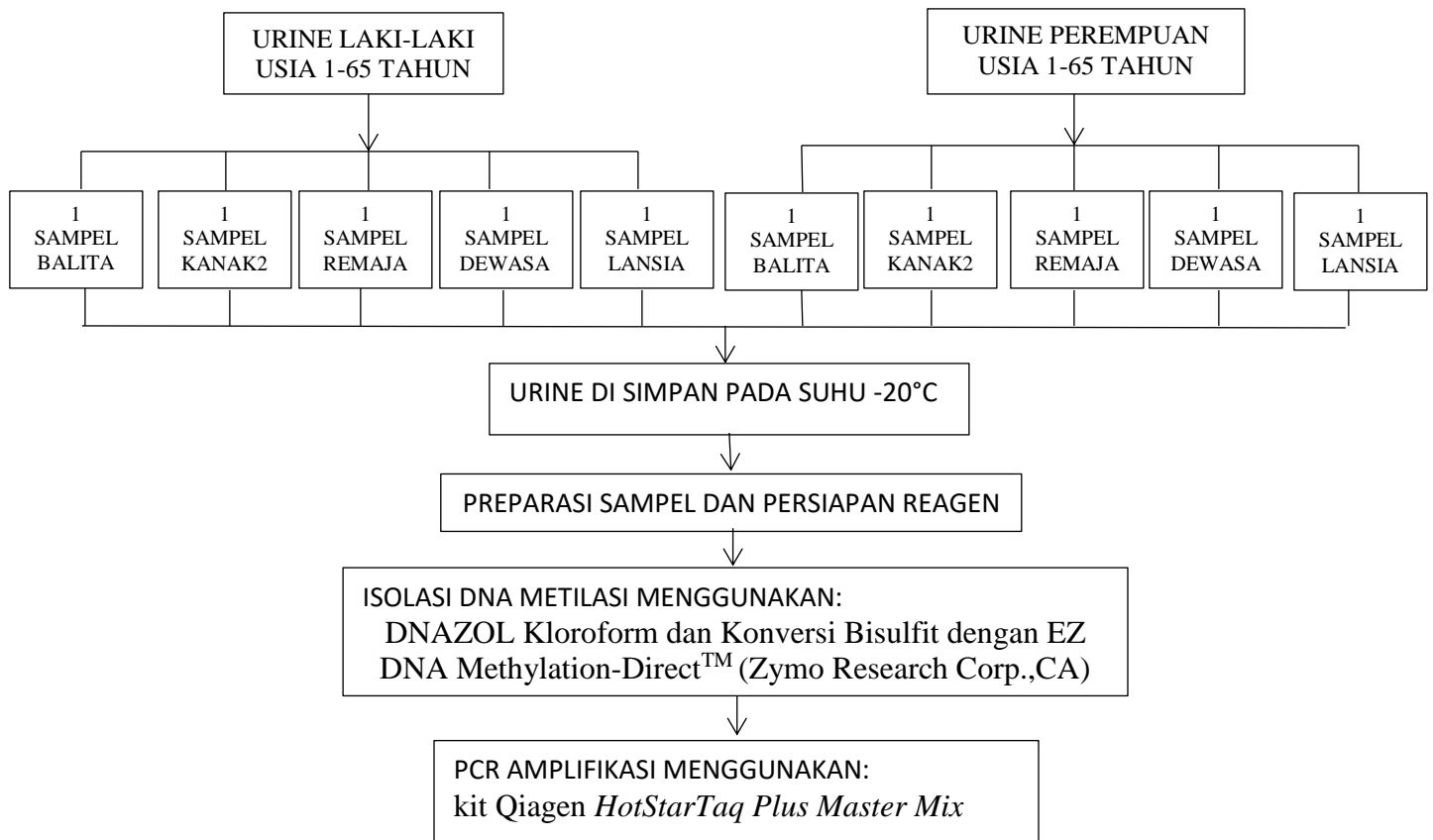
Analisis regresi linier antara umur dan metilasi

Hasil sekuensing yang didapatkan akan berbentuk pulau CpG. Pulau CpG dapat dilihat dan dianalisis dengan menggunakan aplikasi online *Emboss CpGplot* di situs (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/). Persen metilasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Metilasi} = \frac{\text{panjang perkiraan situs CpG}}{\text{jumlah sekuens}} \times 100 \%$$

Hasil yang didapat diregresikan antara umur dengan jumlah persen metilasi yang terdapat pada DNA individu tersebut. Hasil akan di analisis dengan program SPSS (Yi, 2014; Parrish, 2012).

4.2 Alur Penelitian



Jadwal penelitian disusun dengan mengisi langsung tabel berikut dengan memperbolehkan penambahan baris sesuai banyaknya kegiatan.

JADWAL

No	Nama Kegiatan	Bulan											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Persiapan pengumpulan sampel	√	√	√									
2	Pemeriksaan lab, analisis				√	√	√	√	√				
3	Laporan, publikasi									√	√	√	√

Daftar pustaka disusun dan ditulis berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan. Hanya pustaka yang disitasi pada usulan penelitian yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

DAFTAR PUSTAKA

1. Agudelo J, Halámková L, Brunelle E, Rodrigues R, Huynh C, Halámek J: Ages at a crime scene: Simultaneous estimation of the time since deposition and age of its originator; *Anal Chem* 88:6479; 2016.
2. Alisch RS, Barwick BG, Chopra P, Myrick LK, Satten GA, Conneely KN, Warren ST: Age-associated DNA methylation in pediatric populations; *Genome Res* 22:623; 2012.
3. Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Van De Voorde W, Decorte R: Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers; *Epigenetics* 10:922; 2015.
4. Bell JT, Tsai PC, Yang TP, Pidsley R, Nisbet J, Glass D, Mangino M, Zhai G, Zhang F, Valdes A, et al.: Epigenomewide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population; *PLoS Genet* 8(4):e1002629; 2012.
5. Bock C, Halbritter F, Carmona FJ, Tierling S, Datlinger P, Assenov Y, Berdasco M, Bergmann AK, Booher K, Busato F, et al.: Quantitative comparison of DNA methylation assays for biomarker development and clinical applications; *Nat Biotechnol* 34; 2016
6. Booth LN, Brunet A: The aging epigenome; *Mol Cell* 62:728; 2016.
7. Børsting C, Morling N: Next generation sequencing and its applications in forensic genetics; *Forensic Sci Int Genet* 18:78; 2015.
8. Buscarlet M, Tessier A, Provost S, Mollica L, Busque L: Human blood cell levels of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) decline with age, partly related to acquired mutations in TET2; *Exp Hematol* 44:1072; 2016.
9. Chen BH, Marioni RE, Colicino E, Peters MJ, WardCaviness CK, Tsai P, Roetker NS, Just AC, Demerath EW, Guan W, et al.: DNA methylation-based measures of biological age: Meta-analysis predicting time to death; *Aging (Albany, NY)* 8:1; 2016.
10. Marioni RE, Shah S, McRae AF, Chen BH, Colicino E, Harris SE, Gibson J, Henders AK, Redmond P, Cox SR, et al.: DNA methylation age of blood predicts all-cause mortality in later life; *Genome Biol* 16:25; 2015.

11. Márquez-Grant N: An overview of age estimation in forensic anthropology: Perspectives and practical considerations; *Ann Hum Biol* 42:308; 2015.

LAMPIRAN 1. BIODATA PENGUSUL

A. BIODATA KETUA PENGUSUL

Nama	Dr. dr. AHMAD YUDIANTO S.Ked, Sp.F, M.Kes
NIDN/NIDK	8888130017
Pangkat/Jabatan	-/Lektor
E-mail	ahmad-yudianto@fk.unair.ac.id
ID Sinta	5986352
h-Index	0

Publikasi di Jurnal Internasional terindeks

No	Judul Artikel	Peran (First author, Corresponding author, atau co-author)	Nama Jurnal, Tahun terbit, Volume, Nomor, P-ISSN/E-ISSN	URL artikel (jika ada)
1	DNA QUALITY AND QUANTITY TEST OF SPERM IN FRESHWATER		Atlantis Press, 2017, 98, -, 2352-5398	https://www.atlantis

Publikasi di Jurnal Nasional Terakreditasi Peringkat 1 dan 2

No	Judul Artikel	Peran (First author, Corresponding author, atau co-author)	Nama Jurnal, Tahun terbit, Volume, Nomor, P-ISSN/E-ISSN	URL artikel (jika ada)
1	EPIPHYSEAL CLOSURE TIME OF RADIUS AND ULNA BONES OF THE PROXIMAL SECTION	co-author	Folia Medica Indonesiana, 2018, 54, 2, 2599-056x	https://e-journal.un
2	FORENSIC IDENTIFICATION OF BLOOD TYPES IN PEAR (<i>Pyrus bretschneideri</i>) FRUIT BITEMARK	co-author	Folia Medica Indonesiana, 2018, 54, 4, 2599-056x	https://e-journal.un
3	IDENTIFICATION OF HUMAN DNA IN MIXTURE OF HUMAN AND CHICKEN BLOOD USING PCR WITH SPECIFIC PRIMER OF CYTOCHROME B GENE	co-author	Folia Medica Indonesiana, 2018, 54, 3, 2599-056x	https://e-journal.un
4	LOCAL MAPPING PROFILE OF MITOCHONDRIAL DNA (MtDNA)-Loop IN FORENSIC IDENTIFICATION	first author	Folia Medica Indonesiana, 2018, 54, 3, 2599-056x	https://e-journal.un
5	THE EFFECT OF TIME ON BLOOD TYPES OF ABO SYSTEMS ON SALIVA SPOTS OF CIGARETTE BUTTS FOR FORENSIC IDENTIFICATION	co-author	Folia Medica Indonesiana, 2018, 54, 4, 2599-056x	https://e-journal.un
6	Effect of room temperature on the quality of DNA from		Folia Medica, 2017, 53, 2, 2355-8393	https://e-journal.un

	earphone swabby observing mitochondrial DNA [mtDNA]			
7	DNA ISOLATION FROM HUMAN URINE STAIN AS AN ALTERNATIVE MATERIAL FOR PERSONAL IDENTIFICATION EXAMINATION		Folia Medica Indonesiana, 2016, 52, 4, 2355-8393	http://e-journal.una

Prosiding seminar/konverensi internasional terindeks

No	Judul Artikel	Peran (First author, Corresponding author, atau co-author)	Nama Jurnal, Tahun terbit, Volume, Nomor, P-ISSN/E-ISSN	URL artikel (jika ada)
1	The Identification of Human and Animal Blood Mixtures Using Human Cytochrome b Gene	co-author	Advances in Social Science, Education and Humanities Research (ASSEHR), 2017, 98, 1, 2352-5398	Atlantis Press
2	THE USE OF CELL FREE FETAL DNA [cff-DNA] AS NON-INVASIVE TECHNIQUES ON PATERNITY TEST [FORENSIC IDENTIFICATION]	first author	Advances in Social Science, Education and Humanities Research (ASSEHR), volume 98 1st International Conference Postgraduate School Universitas Airlangga: Implementation of Climate Change Agreement to Meet Sustainable Development Goals , 2017, 98, 1, 2352-5398	atlantis press

Buku

No	Judul Buku	Tahun Penerbitan	ISBN	Penerbit	URL (jika ada)
1	panduan laboratorium DNA forensik	2015	978-602-0840-62-8	PT REVKA PETRA MEDIA	http://www.revkapetr
2	PEMERIKSAAN IDENTIFIKASI FORENSIK MOLEKULER	2015	978-602-7676-15-2	GLOBAL PERSADA PRESS	http://www.globalpra
3	PANDUAN PRAKTIS SEROLOGI FORENSIK	2013	978-602-7676-10-7	GLOBAL PERSADA PRESS	http://www.globalper

Perolehan KI

No	Judul KI	Tahun Perolehan	Jenis KI	Nomor	Status KI (terdaftar/granted)	URL (jika ada)
----	----------	-----------------	----------	-------	-------------------------------	----------------

B. ANGGOTA PENGUSUL 1

Nama	Dr MASNIARI NOVITA M.Kes
NIDN/NIDK	0025116803
Pangkat/Jabatan	-/Lektor
E-mail	masniari@unej.ac.id
ID Sinta	6017855
h-Index	0

Publikasi di Jurnal Internasional terindeks

No	Judul Artikel	Peran (First author, Corresponding author, atau co-author)	Nama Jurnal, Tahun terbit, Volume, Nomor, P-ISSN/E-ISSN	URL artikel (jika ada)
----	---------------	--	---	------------------------

Publikasi di Jurnal Nasional Terakreditasi Peringkat 1 dan 2

No	Judul Artikel	Peran (First author, Corresponding author, atau co-author)	Nama Jurnal, Tahun terbit, Volume, Nomor, P-ISSN/E-ISSN	URL artikel (jika ada)
----	---------------	--	---	------------------------

Prosiding seminar/konferensi internasional terindeks

No	Judul Artikel	Peran (First author, Corresponding author, atau co-author)	Nama Jurnal, Tahun terbit, Volume, Nomor, P-ISSN/E-ISSN	URL artikel (jika ada)
----	---------------	--	---	------------------------

Buku

No	Judul Buku	Tahun Penerbitan	ISBN	Penerbit	URL (jika ada)
----	------------	------------------	------	----------	----------------

Perolehan KI

No	Judul KI	Tahun Perolehan	Jenis KI	Nomor	Status KI (terdaftar/granted)	URL (jika ada)
----	----------	-----------------	----------	-------	-------------------------------	----------------

LAMPIRAN 3. BUKTI PEROLEHAN KI

PERSETUJUAN USULAN

Tanggal Pengiriman	Tanggal Persetujuan	Nama Pimpinan Pemberi Persetujuan	Sebutan Jabatan Unit	Nama Unit Lembaga Pengusul
8 Oktober 2018	11 Oktober 2018	Drs HERY PURNOBASUKI M.Si, Ph.D	Ketua	Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga

Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan ringkas mungkin. Dilarang menghapus/memodifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

C. **HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN:** Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian dapat berupa data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

Hasil Penelitian

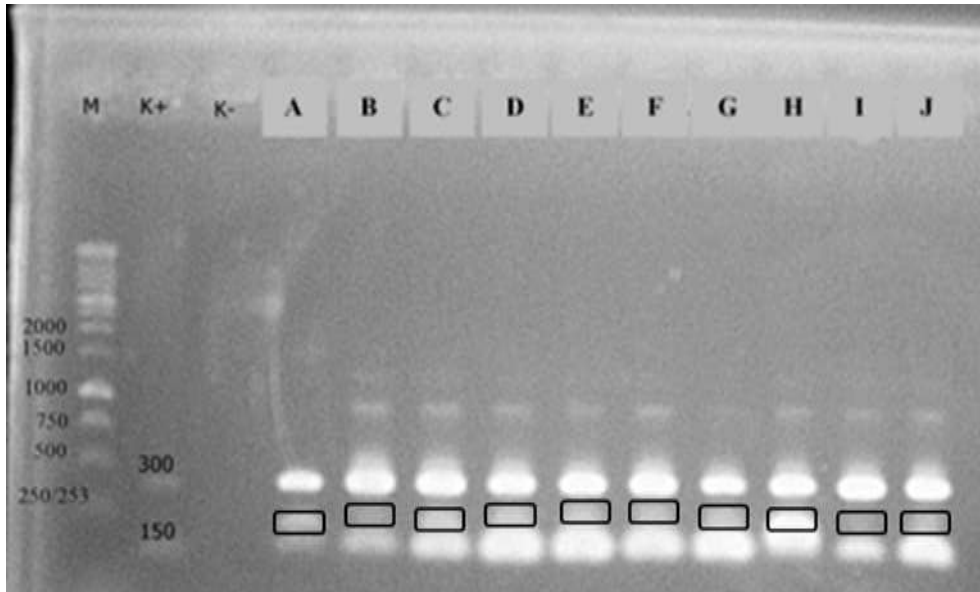
Ekstraksi dan isolasi DNA pada bercak darah menghasilkan konsentrasi dan temuan kemurnian DNA seperti digambarkan pada Tabel 1 di bawah ini. Data sesuai dengan pengukuran UV spektrofotometer penyerapan cahaya pada kepadatan optik 260 nm dan 280 nm.

Tabel 1. Kadar dan kemurnian pada masing-masing sampel bercak darah

Sampel	Kadar ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Kemurnian
A	833	1.16
B	745.5	1.13
C	1050	1.17
D	1589	1.22
E	1526	1.20
F	1092	1.17
G	815.5	1.19
H	1032.5	1.18
I	577.5	1.14
J	1683.5	1.22

Berdasarkan tabel di atas didapatkan kadar DNA terendah adalah 577,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan kadar DNA tertinggi adalah 1683,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Rata-rata kadar DNA pada bercak darah adalah 1094,45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Nilai kemurnian DNA paling rendah adalah 1,13 dan Nilai kemurnian terbesar adalah 1,22. Rata-rata nilai kemurnian DNA pada bercak darah adalah 1,18.

Setelah dilakukan konversi bisulfit, untuk melihat terdapat atau tidaknya DNA pada hasil metilasi dan PCR dilakukan visualisasi dengan menggunakan gel agarose 1%. Dari hasil visualisasi menggunakan elektroforesis gel agarosa didapatkan pita dari 10 sampel tersebut yang pada umumnya berkisar antara 150 bp dan 300 bp.



Gambar 1. Hasil elektroforesis pada gel agarose 1%

Keterangan:

- M = DNA marker 1 Kb
- K+ = Kontrol positif K562
- K- = Kontrol negatif Aquades
- A = Bercak darah balita jenis kelamin laki-laki usia 2 tahun.
- B = Bercak darah anak-anak jenis kelamin laki-laki usia 6 tahun.
- C = Bercak darah remaja jenis kelamin laki-laki usia 20 tahun.
- D = Bercak darah dewasa jenis kelamin laki-laki usia 42 tahun.
- E = Bercak darah lansia jenis kelamin laki-laki usia 47 tahun.
- F = Bercak darah balita jenis kelamin perempuan usia 4 tahun.
- G = Bercak darah anak-anak jenis kelamin perempuan usia 11 tahun.
- H = Bercak darah remaja jenis kelamin perempuan usia 17 tahun.
- I = Bercak darah dewasa jenis kelamin perempuan usia 34 tahun.
- J = Bercak darah lansia jenis kelamin perempuan usia 53 tahun.

Dengan cara perhitungan yang sama seperti pada sampel A dan sampel F maka, didapatkan hasil persen metilasi ke 10 sampel dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 2 Hasil perhitungan persen metilasi pada panjang 300 bp

Kode Sampel	Umur (Tahun)	Jenis kelamin	Perkiraan Panjang situs CpG	Jumlah sekuens	Persen Metilasi (%)
A	2	Laki-laki	0	309	0
B	6	Laki-laki	202	691	29,23
C	20	Laki-laki	257	694	37,03
D	42	Laki-laki	434	829	52,35
E	47	Laki-laki	359	695	51,65
F	4	Perempuan	22	199	11,05
G	11	Perempuan	221	694	31,84
H	17	Perempuan	80	199	40,20
I	34	Perempuan	93	199	46,73
J	53	Perempuan	358	728	49,18

Dari hasil analisis data menggunakan IBM SPSS Statistics 24, pada subyek laki-laki didapatkan nilai r hitung (Pearson Correlation) adalah 0,888 dengan nilai signifikansi 2-tailed bernilai 0,04. Berdasarkan tabel R , didapatkan nilai R untuk $N=5$ dengan signifikansi 5% adalah 0,878, karena r hitung lebih dari r tabel dan nilai signifikansi kurang dari 0,05 maka terdapat korelasi signifikan antara persen metilasi dan umur pada subyek laki-laki.

Pada subyek perempuan didapatkan r hitung (Pearson Correlation) adalah 0,834 dengan nilai signifikansi 2-tailed bernilai 0,079, karena r hitung lebih dari r tabel namun nilai signifikansi lebih dari 0,05 maka terdapat korelasi tidak signifikan antara persen metilasi dan umur pada subyek perempuan.

Pembahasan

Pada penelitian ini didapatkan kadar DNA terendah adalah 577,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan kadar DNA tertinggi adalah 1683,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Rata-rata kadar DNA pada bercak darah adalah 1094,45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Kadar DNA optimal yang dibutuhkan untuk hasil optimal dalam konversi bisulfit adalah 200-500 ng (Holmes et al. 2014). Sehingga hasil isolasi DNA dari bercak darah masih optimal untuk dilakukan konversi bisulfit.

Pada penelitian ini, persen metilasi subyek laki-laki cenderung meningkat selaras dengan kategorisasi usia namun persen metilasi justru menurun pada subyek lansia. Hal ini sangat mungkin dipengaruhi oleh faktor gaya hidup, lingkungan, dan penyakit yang diderita. Sedangkan pada subyek perempuan persen metilasi secara konsisten mengalami peningkatan sesuai dengan kategorisasi usia, meskipun laju peningkatan tersebut tidak secara konstan dapat diukur.

Antara laki-laki dan perempuan, situs CpG memiliki tingkat metilasi DNA yang berbeda secara signifikan. Situs CpG ini ditempatkan pada kromosom autosomal dengan perbedaan absolut dalam metilasi karena situs CpG terlokasi pada kromosom X sehingga perbedaan metilasi spesifik jenis kelamin pada kromosom X cenderung lebih tidak stabil. Kerentanan perempuan terhadap stress dan penyakit tertentu juga sangat mempengaruhi laju metilasi DNA, sehingga faktor-faktor yang mempengaruhi termetilasinya DNA sangat bervariasi pada masing-masing individu (Davegårdh et al. 2019).

Penyakit-penyakit degeneratif dan sindroma metabolik yang dimiliki oleh masing-masing individu juga sangat mempengaruhi hasil persen DNA yang termetilasi. Proses perjalanan penyakit degeneratif menargetkan elemen-elemen mesin epigenetik seluler, mengubah ekspresi dan aktivitas mesin epigenetik sehingga akan mempengaruhi perubahan keadaan epigenetik tiap individu (Neidhart 2016).

Regulator epigenom yang sering diabaikan adalah neuroendokrin, padahal DNA metilasi dapat menjadi proses yang dinamis, dimana keadaan hormonal individu sangat mempengaruhi peran hidrosimetilasi sitosin. Penggunaan obat-obatan tertentu yang bersifat oksidatif maupun antioksidan juga akan memberikan efek terhadap laju modifikasi histon. Ini dapat terjadi, misalnya, melalui mutasi sitosin dalam kasus mereka dimetilasi dalam sel normal. Tidak adanya sitosin teretilasi dapat menyebabkan modifikasi histone permisif dan memungkinkan gen untuk diekspresikan. Jenis mekanisme ini dapat mengubah fenotip dan perilaku sel (Neidhart 2016).

Penyakit-penyakit neoplastik, degeneratif, metabolik, bahkan inflamasi akan menyebabkan stress oksidatif yang akan mempengaruhi aktivasi dan inaktivasi gen tertentu, serta ketidakstabilan genom, yang terjadi dengan mekanisme epigenetik juga. Tidak seperti mutasi genetik, epimutasi tidak mengubah urutan dasar DNA dan berpotensi reversibel (Neidhart 2016).

D. **STATUS LUARAN:** Tuliskan jenis, identitas dan status ketercapaian setiap luaran wajib dan luaran tambahan (jika ada) yang dijanjikan pada tahun pelaksanaan penelitian. Jenis luaran dapat berupa publikasi, perolehan kekayaan intelektual, hasil pengujian atau luaran lainnya yang telah dijanjikan pada proposal. Uraian status luaran harus didukung dengan bukti kemajuan ketercapaian luaran sesuai dengan luaran yang dijanjikan. Lengkapi isian jenis luaran yang dijanjikan serta unggah bukti dokumen ketercapaian luaran wajib dan luaran tambahan melalui Simlitabmas mengikuti format sebagaimana terlihat pada bagian isian luaran

- Untuk luaran wajib : manuscript sudah selesai direncanakan untuk proceeding internationa conference forensic medicine and legal medicine 2020 di kuala lumpur
- Untuk luaran tambahan : sudah dalam munuscripts

E. **PERAN MITRA:** Tuliskan realisasi kerjasama dan kontribusi Mitra baik *in-kind* maupun *in-cash* (jika ada). Bukti pendukung realisasi kerjasama dan realisasi kontribusi mitra dilaporkan sesuai dengan kondisi yang sebenarnya. Bukti dokumen realisasi kerjasama dengan Mitra diunggah melalui Simlitabmas mengikuti format sebagaimana terlihat pada bagian isian mitra

- Tidak ada mitra

F. **KENDALA PELAKSANAAN PENELITIAN:** Tuliskan kesulitan atau hambatan yang dihadapi selama melakukan penelitian dan mencapai luaran yang dijanjikan, termasuk penjelasan jika pelaksanaan penelitian dan luaran penelitian tidak sesuai dengan yang direncanakan atau dijanjikan.

Proses optimasi PCR yang memakan cukup lama untuk mendapatkan ukuran pasang basa yang sesuai

G. RENCANA TINDAK LANJUT PENELITIAN: Tuliskan dan uraikan rencana tindak lanjut penelitian selanjutnya dengan melihat hasil penelitian yang telah diperoleh. Jika ada target yang belum diselesaikan pada akhir tahun pelaksanaan penelitian, pada bagian ini dapat dituliskan rencana penyelesaian target yang belum tercapai tersebut.

- Estimasi umur melalui metilasi DNA ini dikembangkan pada sampel-sampel yang lain, terutama sampel-sampel biologis yang sering didapatkan di tempat kejadian perkara.
- Target publikasi proceediing internasional dalam awal tahun 2010 sudah terrealisasi serta publikasi pada jurnal nasional terakreditasi teraccepted pada awal 2020.

H. DAFTAR PUSTAKA: Penyusunan Daftar Pustaka berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan. Hanya pustaka yang disitasi pada laporan akhir yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

1. Davegårdh, Cajsa, Elin Hall Wedin, Christa Broholm, Tora Ida Henriksen, Maria Pedersen, Bente Klarlund Pedersen, Camilla Scheele, and Charlotte Ling. 2019. "Sex Influences DNA Methylation and Gene Expression in Human Skeletal Muscle Myoblasts and Myotubes." *Stem Cell Research and Therapy* 10 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1118-4>.
2. Holmes, Emily Eva, Maria Jung, Sebastian Meller, Annette Leisse, Verena Sailer, Julie Zech, Martina Mengdehl, et al. 2014. "Performance Evaluation of Kits for Bisulfite-Conversion of DNA from Tissues, Cell Lines, FFPE Tissues, Aspirates, Lavages, Effusions, Plasma, Serum, and Urine." *PLoS ONE* 9 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093933>.
3. James, Stuart H, and William G Eckert. 1999. *Interpretation of Bloodstain Evidence Second Edition Library of Congress Cataloging-in-Publication Data*.
4. Kumar, Ajay, Dasari Harish, Amandeep Singh, Kulbhushan, and G. A. Sunil Kumar. 2014. "Unknown Dead Bodies: Problems and Solutions." *Journal of Indian Academy of Forensic Medicine* 36 (1): 76–80.
5. Neidhart, Michel. 2016. *DNA Methylation and Complex Human Disease*. Oxford: Elsevier.
6. Schmeling, Andreas, Reinhard Dettmeyer, Ernst Rudolf, Volker Vieth, and Gunther Geserick. 2016. "Forensic Age Estimation: Methods, Certainty, and the Law." *Deutsches Aerzteblatt Online*, 44–50. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0044>.
7. Yi, Shao Hua, Long Chang Xu, Kun Mei, Rong Zhi Yang, and Dai Xin Huang. 2014. "Isolation and Identification of Age-Related DNA Methylation Markers for Forensic Age-Prediction." *Forensic Science International: Genetics* 11 (1): 117–25. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.03.006>.