

TESIS

ISOLASI DNA DARI BERCAK KERINGAT PADA PAKAIAN
SEBAGAI BAHAN IDENTIFIKASI FORENSIK

(PENELITIAN OBSERVASIONAL)



KK
TKD 07/07

Yud
i

AHMAD YUDIANTO
090415338/M

PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006



TESIS

**ISOLASI DNA DARI BERCAK KERINGAT PADA PAKAIAN
SEBAGAI BAHAN IDENTIFIKASI FORENSIK**

(PENELITIAN OBSERVASIONAL)

**AHMAD YUDIANTO
090415338/M**

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006**

**ISOLASI DNA DARI BERCAK KERINGAT PADA PAKAIAN
SEBAGAI BAHAN IDENTIFIKASI FORENSIK**

(PENELITIAN OBSERVASIONAL)

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh

AHMAD YUDIANTO

090415338/M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal 17 April 2006

Lembar pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 10 MEI 2006

Oleh

Pembimbing Ketua



Prof.Dr.Med.HM.Soekry Erfan Kusuma,dr.,Sp.F(K),DFM
NIP 130 359 282

Pembimbing



Dra.Toetik Koesbardiati,Ph.D.,DFM.
NIP 132 048 449

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Prof. Retno Handayani,dr.,MS.,Ph.D.
NIP 130 541 984

Telah diuji pada
Tanggal 17 April 2006

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof.Retno Handayani,dr.,MS.,Ph.D.

Anggota : Prof.Dr.Med.HM.Soekry Erfan Kusuma,dr.,Sp.F(K),DFM.

Prof.H.Kuntoro,dr.,MPH.,Dr(PH).

Dra.Toetik Koesbardiati,Ph.D.,DFM.

Ni Wayan Tirthaningsih,dr.,MS.

UCAPAN TERIMA KASIH

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

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof.Dr.Med.HM.Soekry Erfan Kusuma,dr.Sp.F(K),DFM selaku pembimbing ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah membereikan dorongan, bimbingan dan saran-saran yang membangun sejak saya mengajukan proposal penelitian sampai selesainya tesis ini.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dra.Toetik Koesbardiati,Ph.D.,DFM selaku pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran sejak saya mengajukan proposal penelitian sampai selesainya tesis ini.

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

- Rektor Universitas Airlangga Prof.Dr.Med.H.Puruhito,dr.,Sp.BTKV, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program magister.
- Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof.Dr.H.Muhammad Amin,dr.,Sp.P(K), atas kesempatan yang diberikan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Direktur Tropical Disease Center Universitas Airlangga Prof.Dr.Yoes Prijatna Dachlan,dr.,MSc, atas perkenannya sehingga saya dapat menggunakan fasilitas untuk melaksanakan penelitian di TDC

- Ketua Medical Research Unit (MRU) FK UNAIR Prof.Dr.Suhartono Taat Putra,dr.,MS, atas perkenannya saya mendapatkan financial dalam penelitian ini sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.
- Prof.Retno Handayani,dr.,MS.,Ph.D, selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar yang dengan kesabaran membimbing kami selama mengikuti pendidikan Program Magister.
- Prof.H.Kuntoro,dr.,MPH.,Dr(PH), yang telah membimbing dalam metodologi penelitian dan statistik sehingga tesis ini dapat diselesaikan.
- Ibu Ni Wayan Tirthaningsih,dr.,MS, selaku konsultan bidang Genetika Kedokteran yang dengan penuh perhatian telah membimbing, memberi masukan dan arahan dalam tesis ini.
- Bapak Chusen dan Indah Nuraini,S.Si, yang telah membantu banyak dalam menyelesaikan penelitian dalam tesis ini.
- Kedua orang tua saya (Bpk Hasan & Ibu Yusmani(alm)) di Madura serta adik-adikku: Hadi, Desi dan Dandank yang telah banyak membantu kelancaran penyelesaian tesis ini.
- Istriku drg.Ayu Nawang Setyariny dan anakku Kiky yang dengan tulus dan penuh cinta telah memberikan kesempatan, waktu, dorongan dan doa dalam menjalani pendidikan program magister.
- Para PPDS Ilmu Kedokteran Forensik : dr Eriko, dr Wening, dr.Azis, dr. Warih dan dr.Nabil serta para staff dan karyawan di lingkungan Instalasi/SMF Ilmu Kedokteran Forensik dan Medikolegal RSUD Soetomo Surabaya atas partisipasinya dalam penyusunan tesis ini. Serta sahabatku Daniel Umar,dr.,Sp.F.,SH dan Kompol H.Herry Wijatmoko,dr.Sp.F.,DFM yang pernah membantu dalam pendidikan program pascasarjana ini.

- Teman-teman angkatan 2004 Program IKD *combined degree*: dr.Deny, dr.Mega, dr.Sukma, dr.Lukas, dr.Sulis, dr.Idrus, dr.Eva, dr.Anny, dr.Oot, dr.Joe, dr.Berta, dr.Paul, dr. Gery serta sahabatku drg Agung Sosiawan, M.kes dan drg Masniari Novita, M.kes yang telah mendukung saya baik dalam duka dan suka selama mengikuti pendidikan ini, serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang terlibat baik langsung maupun tidak langsung dalam penyelesaian tesis ini.

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

Penulis

Ringkasan

ISOLASI DNA DARI BERCAK KERINGAT PADA PAKAIAN SEBAGAI BAHAN IDENTIFIKASI FORENSIK

AHMAD YUDIANTO

DNA profiling telah diakui sebagai suatu sarana yang canggih dalam identifikasi untuk membantu pihak penyidik dan penuntut umum dalam perkara tindak pidana maupun perdata.

Selama ini sampel yang banyak dipakai dalam pemeriksaan DNA untuk mengidentifikasi adalah bercak darah/darah, bercak sperma, *vaginal swab*, *buccal swab* dan tulang. Sering pelaku tindak criminal berusaha menghilangkan missal dengan cara pencucian baju atau dibakar. Sebenarnya selain bercak darah/sperma masih terdapat bercak keringat yang melekat pada pakaian. Sampai saat ini identifikasi personal melalui bercak keringat pada pakaian dengan metode analisis DNA (DNA profiling) belum banyak dilakukan. Berdasarkan hal-hal tersebut diatas, peneliti ingin mengetahui: apakah pemeriksaan bercak keringat pada pakaian melalui analisis DNA dapat digunakan untuk identifikasi jati diri seseorang.?

Penelitian ini bertujuan mengetahui identitas personal melalui isolasi DNA dari bercak keringat pada pakaian melalui lokus CSF1PO, THO1, TPOX, vWA dan D17S5.

Manfaat dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi ilmiah bagi ilmu kedokteran forensik dalam identifikasi personal serta bantuan penyidik (POLRI) dalam menegakkan hukum di Indonesia.

Penelitian ini adalah penelitian observasional dan dilakukan di *Tropical Disease Center* UNAIR. Waktu Penelitian : November 2005 - Februari 2006. Besar sampel 10 buah. Sampel diambil dari bercak keringat pada pakaian sukarelawan yang dikenakan selama 1 minggu terus-menerus, dibagian kerah, lengan dan ketiak serta darah sebagai pembanding. Selanjutnya dilakukan isolasi DNA pada bercak keringat pada pakaian dan darah dengan DNAzol. Amplifikasi PCR pada lokus CSF1PO, THO1, TPOX, vWA dan D17S5. *Electrophorese* dengan *polyacrylamide agarose composit gel*. Visualisasi *electrophoresis* tersebut

menggunakan *marker ladder 100 bp* dan *marker K562* sebagai control positif yang hasilnya berupa pita.

Dari 10 sampel yang digunakan ternyata hanya 6 sampel yang memenuhi syarat untuk dilakukan *typing*. Secara teoritis kadar DNA tersebut diharapkan masih dapat digunakan dalam proses DNA *profiling*, yang mensyaratkan jumlah atau kadar DNA sekitar 20 ng/μl untuk *typing* (Notosoehardjo, 1999b: Gatut et al, 2004). Disamping itu juga kemurnian yang ideal 1,8-2 untuk dsDNA, sehingga sampel yang dapat digunakan *typing* yaitu no 1,2,4,6,7 dan 9. Visualisasi elektroforesis yang berupa pita, sesuai dengan ukuran *basepairnya* yakni THO1: 100-200 bp, TPOX: 200-250 bp, CSF1PO: 300-350 bp, vWA: 100-200 bp dan D17S5: 180-1440 bp. Kemudian pita bercak keringat (A) dan darah (B) dibandingkan apakah sejajar (*identik/konsisten/matching*) pada lokus tertentu.

Identifikasi personal sangat diperlukan pada berbagai kasus forensik. Perkembangan analisis DNA dan aplikasinya saat ini untuk identifikasi bukti biologis telah merubah kemampuan identifikasi barang bukti.

Pada umumnya sampel-sampel forensik baik yang didapat di tempat kejadian perkara atau tubuh korban/tersangka dalam jumlah sangat sedikit dan sudah terdegradasi, sehingga sulit untuk dianalisa secara konvensional dengan *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Amplifikasi sampel forensik tersebut dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat menghasilkan informasi genetika individual. Metode PCR merupakan suatu metode untuk memperbanyak fragmen DNA tertentu secara *in vitro* dengan menggunakan enzim *polimerase* DNA.

Dalam penelitian ini pada isolasi DNA dari bercak keringat dilakukan PCR 2X (*second amplification*) karena kadar DNANYA yang didapat sangat rendah yakni antara 15,32 - 40,43 ng/μl, secara teoritis untuk *typing* minimal 20 ng/μl (Notosoehardjo, 1999b: Gatut et al, 2004). Untuk mendapatkan hasil visualisasi yang adekuat dibutuhkan kualitas atau kemurnian DNA yang adekuat dan kadar DNA yang memadai (Muladno, 2002), sehingga DNA dapat digunakan sebagai bahan pemeriksaan DNA termasuk dalam hal ini adalah identifikasi dan tes paternitas. Berkenaan dengan kadar DNA yang diperoleh dari

bercak keringat tersebut, sebenarnya juga tidak terlepas dari komposisi dari bercak keringat yang melekat di pakaian yang terdiri dari sekresi *Sebaceous glands*, kelenjar keringat dan *keratinosit* epidermis, serta bahan pakaian atau lama pakaian tersebut digunakan. Sehingga faktor-faktor inilah yang mempengaruhi jumlah keringat, sebum dan sel epitel yang lepas melekat pada pakaian yang berkaitan dengan jumlah sel somatik berinti.

Penelitian ini menunjukkan bahwa lokus THO1, TPOX, CSF1PO dan vWA pada bercak keringat (A) identik dengan darah (B). Sedangkan lokus D17S5 belum bisa dilakukan karena sedikitnya sisa DNA yang didapat dari bercak keringat. Penelitian tentang bercak keringat sampai saat ini belum banyak dipublikasikan, sehingga masih banyak yang belum terungkap terutama sebagai bahan identifikasi forensik.

Pada dasarnya bercak keringat pada pakaian dapat menjadi bahan alternatif dalam identifikasi forensic meskipun diperlukan amplifikasi PCR yang berulang kali untuk mendapatkan visualisasi yang jelas, sebagaimana yang sering terjadi pada kasus-kasus forensic dengan *sample sources* yang minimal.

Sebagai kesimpulan penelitian ini adalah bercak keringat pada pakaian dapat digunakan sebagai bahan alternatif identifikasi forensic melalui pemeriksaan forensic molekuler. Namun ini masih perlu dilakukan penelitian lanjut pengaruh-pengaruh perlakuan atau faktor lingkungan pada bercak keringat di pakaian sebagai bahan identifikasi forensic melalui molekuler forensic.

ABSTRAK**ISOLASI DNA DARI BERCAK KERINGAT PADA PAKAIAN
SEBAGAI BAHAN IDENTIFIKASI FORENSIK**

DNA profiling telah diakui sebagai suatu sarana yang canggih untuk membantu pihak penyidik dan penuntut umum dalam perkara tindak pidana maupun perdata. Dan juga terbukti mempunyai kegunaan yang sangat besar dalam identifikasi forensik.

Sampai saat ini di Indonesia identifikasi personal melalui bercak keringat pada pakaian dengan metode analisis DNA (*DNA Profiling*) belum dilakukan. Dalam penelitian ini dilakukan terhadap bercak keringat sukarelawan pada pakaian melalui analisis DNA untuk bahan identifikasi forensik. Lokus-lokus yang digunakan dalam penelitian ini adalah: CSF1PO, THO1, TPOX, vWA dan D17S5. Dari 10 sampel yang digunakan hanya 6 memenuhi persyaratan *typing* (kadar $> 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Sebagai pembanding digunakan dari darah sukarelawan. Lokus D17S5 tidak dilakukan pemeriksaan oleh karena sedikitnya sisa DNA yang dihasilkan dari bercak keringat. Ke 4 lokus tersebut pada visualisasi elektroforesis yang berupa pita jika dibanding antara bercak keringat (A) dan darah (B) adalah identik/ konsisten/ *matching*.

Sebagai kesimpulan penelitian ini adalah bercak keringat pada pakaian dapat sebagai bahan alternatif identifikasi forensik melalui pemeriksaan forensik molekuler.

Kata kunci : Bercak keringat pada pakaian, STR Lokus, identifikasi forensik

Summary

DNA ISOLATION FROM PERSPIRATORY TRACE CLOTHES AS MATERIAL FOR FORENSIC IDENTIFICATION

AHMAD YUDIANTO

DNA profiling is recognized as a sophisticated instrument in an identification for helping the police and public prosecutor to deal with the criminal and civil cases.

So far the samples used in DNA test for identification purpose are including the blood trace/blood, sperm trace, vaginal swab, buccal swab and bone. The criminal actors frequently try to abolish the evidences by washing or burning their clothes. However, besides the blood/sperm trace there is a trace of perspiration attached to the clothes. Until now the personal identification through the perspiratory trace sticking to the clothes using DNA analysis method (DNA profiling) is rarely undertaken. In this research, the problem can be stated that “can the perspiratory trace of the clothes through DNA analysis be used to reveal personal identity?”

The research is conducted with a single purpose of revealing the personal identity through DNA isolation from the perspiratory trace of the clothes through CSF1PO, THO1, TPOX, vWA and D17S5 loci.

The results of research provide a significant contribution to the forensic medicine in doing personal identification and in supporting the police (POLRI) to accomplish the law enforcement in Indonesia.

This research is an observational research and it was undertaken at Tropical Disease Center of Airlangga University (UNAIR) during November 2005 - February 2006. It covered ten samples. The sample was drawn from the perspiratory trace of the volunteers' clothes which they wore for a week consecutively in several parts of the clothes, particularly in collar, sleeve and ampit. The blood was used as the control. Furthermore, DNA was isolated from the perspiratory tarces of the clothes and blood using DNazol. PCR amplification of CSF1PO, THO1, TPOX, vWA and D17S5 loci was done. In addition, the

electrophoresis with polyacrylamid agarose composite gel was carried out. The electrophoresis could be visualized using marker ladder 100 bp and marker K562 as the positive control whose result may be in the form of bands.

From ten samples used in the research, only six samples qualified for typing. Theoretically, the quantity of DNA as mentioned above can still be used in the DNA profiling process, requiring DNA level at approximately 20 ng/ μ l for typing purpose (Notosoehardjo, 1999; Gatut et al, 2004). In addition, the ideal purity of 1,8 – 2 for dsDNA is important, so that the samples which can be employed are those with number 1, 2, 4, 6, 7 and 9. The electrophoresis visualization takes the form of bands in the light of its base pairs namely CSF1PO: 295 – 327 bp, THO1: 179 – 203 bp, TPOX: 224 – 252 bp, vWA: 139 – 167 bp and D17S5 : 180 – 1440 bp. Next, bands of perspiratory traces (A) and blood (B) are compared to know they are identical or consistent with a certain locus.

The personal identification is absolutely required in many forensic cases. Recent advancements in DNA analysis and its application for identifying the biological evidence has considerably changed the ability of identifying the evidence.

By and large, some forensic samples either derived from the scene or the victim/suspect's bodies are in very small quantity and have been seriously degraded, leading to a great difficulty in testing them conventionally using restriction fragment length polymerase (RFLP). The forensic sample amplification making the use of Polymerase Chain Reaction (PCR) can provide individual genetic fragments in vitro using DNA polymerase enzyme.

In the research, PCR 2X (second amplification) is executed in DNA isolation of the perspiratory traces as the DNA level obtained is very small in range of 15.32 – 40. 43 ng/ μ l. Conversely, in theory, minimum 20 ng/ μ l DNA is required for typing (Notosoehardjo, 1999b; Gatut et al, 2004). Thus, the DNA with adequate quality and purity and their adequate level should be obtained to have adequate visualization result (Muladno, 2002), suggesting that such DNA can be used for personal identification and paternity test. Regarding the DNA quantity collected from the perspiratory traces, the composition of the traces

sticking to the clothes consisting of sebaceous glands, perspiratory glands and epidermal keratinocyte, and the clothing material and duration of wearing must also be taken into account. These factors bring about a significant effect on the amount of sweat secreted, sebum and epithelial cells attached to the clothes in associated with number of nuclear somatic cells.

The research indicated that the THO1, TPOX, CSF1PO and vWA loci existing in the perspiratory traces (A) were identical to the blood (B), although D17S5 locus has not been performed due to lack of DNA level derived from the perspiratory traces.

The research on the perspiratory traces until today has not been much published yet, so that many things related to it are not known obviously, specially as the material identification.

Generally, the perspiratory traces of clothes can constitute an alternative material for forensic identification despite repeated PCR amplification to reach optimal visualization as may be the case in many forensic cases with minimum sample sources.

In conclusion, the perspiratory traces of the clothes can use the good alternative material for forensic identification through molecular forensic test. However, further researches on an effect treatment or environmental factor on the perspiratory traces present in the clothes as material for forensic identification through forensic molecular test need to be carried out as well.

ABSTRACT

DNA ISOLATION FROM PERSPIRATORY TRACE CLOTHES AS MATERIAL FOR FORENSIC IDENTIFICATION

DNA profiling have recognized as a sophisticate tool to help investigator and public prosecutor in criminal cases or civil cases. And this prove have great benefit in forensic identification.

Until now, in Indonesia, personal identification through perspiratory traces of clothes by method of DNA analysis (DNA Profiling) is yet done. This research about perspiratory traces of clothes volunteer through to DNA analysis for substance of forensic identification have been done. This research use locus that is : CSFIPO, THO1, TPOX, vWA and D17S5. From 10 sample are use just 6 requisite of typing (kuantitet > 20 ng/μl). As consederation use voluntary blood. Locus D17S5 without inspection because the amount of DNA is result from minimum/little perspiratory traces. That 4 locus on visualization electrophorese is band if consider between perspiratory traces and blood sample is identic/matching.

In conclusion, perspiratory traces of clothes can be as an alternative of forensic identification through the molecular forensic research

Key word : perspiratory traces of clothes, STR locus, forensic identification

DAFTAR ISI

	Halaman
Daftar Isi -----	xvii
Daftar Tabel -----	xix
Daftar Gambar -----	xx
Daftar Lampiran -----	xxi
Daftar Singkatan dan Istilah -----	xxii
BAB 1 PENDAHULUAN -----	1
1.1. Latar Belakang Masalah -----	1
1.2. Rumusan Masalah -----	3
1.3. Tujuan Penelitian -----	3
1.3.1. Tujuan Umum -----	3
1.3.2. Tujuan Khusus -----	4
1.4. Manfaat Penelitian -----	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA -----	5
2.1. Identifikasi Forensik dengan Analisa DNA -----	5
2.2. Komponen Bercak Keringat -----	13
2.3. STR (<i>Short Tandem Repeat</i>) Marker yang umum digunakan -----	16
2.4. Isolasi DNA bercak keringat -----	20
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL -----	23
BAB 4 METODE PENELITIAN -----	25
4.1. Jenis Penelitian -----	25
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian -----	25
4.3. Sampel dan besar sampel -----	25

4.3.1. Sampel -----	25
4.3.2 .Besar sampel-----	25
4.3.3. Kriteria Sampel -----	25
4.4. Bahan Penelitian -----	26
4.5. Alat Penelitian -----	27
4.6. Kerangka Operasional penelitian -----	28
4.7. Cara Kerja -----	30
4.8. Analisa Data -----	36
BAB 5 HASIL PENELITIAN -----	37
5.1. Data Hasil Penelitian -----	37
5.2. Analisis Hasil penelitian -----	45
BAB 6 PEMBAHASAN -----	47
BAB 7 PENUTUP -----	53
7.1. Kesimpulan -----	53
7.2. Saran -----	53
DAFTAR PUSTAKA -----	54
LAMPIRAN -----	58
- Pernyataan persetujuan	
- Gambar bahan dan alat penelitian	

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1. : Kadar dan Kemurnian DNA dari bercak keringat -----	37
Tabel 5.2. : Hasil Pembacaan visualisasi electrophoresis antara bercak keringat dengan darah sampel pada lokus CSF1PO, THO1, TPOX dan vWA. -----	45

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1: Struktur DNA -----	8
Gambar 5.1: Visualisasi lokus TPOX dan THO1 pada sampel no 1 dan 6 setelah PCR 1X -----	39
Gambar 5.2: Visualisasi lokus TPOX dan THO1 pada sampel no 1 dan 6 setelah PCR 2X -----	39
Gambar 5.3: Visualisasi lokus THO1 dan CSF1PO pada sampel no 2 dan 4 setelah PCR 2X-----	40
Gambar 5.4: Visualisasi lokus THO1 pada sampel no 9 setelah PCR 2X-----	41
Gambar 5.5: Visualisasi lokus vWA pada sampel no 1 dan 2 PCR 2X -----	41
Gambar 5.6: Visualisasi lokus TPOX sampel 2, 4 dan 7 PCR 2X -----	42
Gambar 5.7: Visualisasi alel vWA sampel no 4, 6 dan 7 PCR 2 X -----	42
Gambar 5.8: Visualisasi Lokus CSF1PO sampel no 6, 7 dan 9 -----	43
Gambar 5.9: Visualisasi Lokus CSF1PO sampel no 1 dan 7 -----	43
Gambar 5.10: Visualisasi Lokus vWA sampel no 4,6 dan 7 -----	44
Gambar 5.11: Marker CTT Multiplex dan FFv multiplex -----	44

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Pernyataan Persetujuan -----	58
Lampiran 2 : Bahan dan Alat Penelitian -----	59

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

- CODIS : *Combined DNA Index System*
- CTT : CSF1PO, THO1, TPOX
- DNA : *Deoxyribonucleotic acid*
- dsDNA : *Double-strand-DNA*
- EDNAP : *European DNA Profiling Group*
- ENSFI : *European Network of Forensic Science Institute*
- FBI : *Federal Bureau Investigation*
- FFv : F13AO1, FESFPS, vWA
- LTR : *Long Tandem Repeat*
- mtDNA : *Mitochondria DNA*
- nuDNA : *Nucleus-DNA=cDNA= Core-DNA*
- OD : *Optical Densitas*
- PCR : *Polymerase Chain Reaction*
- RFLP : *Restriction Fragmen Length Polymorphisms*
- RNA : *Ribonucleid Acid*
- ssDNA : *Single-strand-DNA*
- STR : *Short Tandem Repeat*
- TKP : *Tempat Kejadian Perkara*
- UV : *Ultra-Violet*
- VNTR : *Variable Number of Tandem Repeat*
- TBE : *Tris Boric EDTA*

BAB 1

PENDAHULUAN

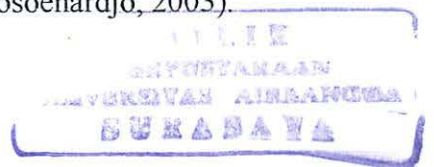
1.1. Latar Belakang Masalah

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

Identifikasi dalam kedokteran forensik diantaranya sidik jari (*daktiloskopi*), pemeriksaan *property*, medis, gigi-geligi, serologi dengan metode eksklusif. Saat ini metode identifikasi telah berkembang kearah forensik molekuler. Forensik molekuler pertamakali diperkenalkan oleh Sir Alex Jefreys tahun 1985, yang memanfaatkan pengetahuan kedokteran dan biologi pada tingkat molekul atau DNA (*Deoxyribonucleotic acid*) (Notosoehardjo, 2001).

DNA merupakan unit keturunan terkecil dan terdapat pada semua mahluk hidup mulai dari mikroorganisme sampai organisme tingkat tinggi seperti manusia, hewan dan tanaman. Menurut Notosoehardjo (2000) tiap jaringan mempunyai kandungan DNA yang berbeda-beda tergantung struktur serta komposisi selnya. Sebagian besar jaringan dengan sel berinti dan sebagian kecil jaringan ikat umumnya mempunyai kadar DNA tinggi. Pemilihan organ yang akan diisolasi DNA guna analisis kasus forensik sangatlah penting.

Setiap bagian tubuh manusia dapat diambil sebagai spesimen oleh karena setiap sel yang berinti dalam tubuh seseorang memiliki rangkaian DNA identik, dimana seorang anak pada dasarnya menerima jumlah material genetika yang sama dari ibu dan ayah kandungnya (hukum pewarisan sifat dari Mendel) (Notosoehardjo, 2003).



Selama ini specimen/sampel yang banyak dipakai dalam pemeriksaan DNA untuk mengidentifikasi, adalah bercak darah/darah, bercak sperma, *vaginal swab*, *buccal swab* dan tulang (Kusuma, 2004).

Didalam kedokteran forensik salah satu pemeriksaan yang sangat membantu penyidikan yakni pemeriksaan barang bukti, yang ada di tubuh korban/pelaku kejahatan dan tempat kejadian perkara (TKP).

Kadangkala pelaku tindak kejahatan sering menghilangkan/mengaburkan barang bukti pelaku atau korban, bercak darah misalnya, yang sering dengan pencucian. Biasanya cara pencucian pelaku terfokus pada bercak darah tersebut sehingga hanya bercak darah saja yang dicuci atau dipotong/dibakar. Pada pakaian selain bercak darah masih ada bercak keringat yang melekat terutama pada daerah tertentu misal dikerah leher pakaian, lengan ataupun bagian ketiak pakaian.

Bercak keringat pada pakaian merupakan hasil sekresi 2 jenis kelenjar yakni kelenjar yang menghasilkan sekret berair; keringat dan lainnya mensekresi bahan berminyak: sebum, disamping itu juga terdapat epidermis yang mati dan terlepas.

Kelenjar keringat (*sudorifera glands*; *sweat glands*) terdapat hampir diseluruh tubuh, yang jumlahnya berkisar 3 sampai 4 juta, berat keseluruhannya kira-kira sama dengan sebuah ginjal. Sedangkan kelenjar lemak (*sebaceous glands*) terdapat diseluruh permukaan kulit kecuali telapak tangan, telapak kaki dan sisi kaki dimana tidak terdapat rambut. Sel-sel kelenjar ini melepaskan getah isinya rata-rata setiap 7,4 hari sehingga mengalami perubahan bentuk sel (Champion et al, 1992). Sel-sel epitel permukaan yang disebut epidermis, selalu diperbaharui melalui mitosis sel-sel dalam lapisan basal. Sel-sel yang baru dibentuk melalui proliferasi sel-sel lapis basal, secara berangsur bergeser kepermukaan epidermis, waktu yang diperlukan

untuk mencapai permukaan adalah 20 sampai 30 hari yang disebut proses *sitomorfosis* (Fawcet, 2002)

Komposisi bercak keringat pada pakaian merupakan hasil sekresi kelenjar keringat (*Sudorifera glands*) dan kelenjar lemak (*Sebaceous glands*) serta sel epitel yang mati dan terlepas. Berkenaan dengan komposisi tersebut, maka bercak keringat dipakaian mengandung sel somatik yang berinti berasal dari degradasi sel kelenjar dan sel epitel kulit yang telah mati, sehingga dari sel-sel ini dapat dilakukan ekstraksi DNA.

Sampai saat ini di Indonesia identifikasi personal melalui bercak keringat pada pakaian dengan metode analisis DNA (*DNA Profiling*) belum banyak dilakukan, sehingga penelitian ini diharapkan dapat memberi jawaban pada hal-hal yang terkait dengan efektivitas penggunaan bercak keringat sebagai bahan identifikasi forensik.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan pada latar belakang tersebut diatas, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

“Apakah pemeriksaan bercak keringat pada pakaian melalui analisis DNA dapat digunakan untuk identifikasi jati diri seseorang ?”

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Untuk membuktikan identitas personal melalui analisis dari hasil isolasi DNA dari bercak keringat pada pakaian

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui identitas personal melalui analisis hasil isolasi DNA dari bercak keringat di pakaian pada lokus TH01, TPOX, CSF1PO, vWA dan D17S5 di Indonesia.
2. Untuk mengetahui identitas personal melalui analisis hasil isolasi DNA darah pada lokus TH01, TPOX, CSF1PO, vWA dan D17S5 di Indonesia.
3. Untuk membandingkan pola pita DNA hasil elektroforesis isolasi DNA dari bercak keringat di pakaian dan isolasi DNA dari darah

1.4. Manfaat penelitian

1. Secara teoritis, diharapkan hasil penelitian ini dapat memberi tambahan informasi ilmiah bagi Ilmu Kedokteran Forensik terutama dalam identifikasi personal .
2. Secara praktis, diharapkan hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan untuk memberi bantuan bagi penyidik dalam hal ini POLRI dalam menegakkan hukum di Indonesia.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Identifikasi forensik dengan analisis DNA

Sejak ditemukannya struktur molekul DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) oleh Watson dan Crick pada tahun 1953, perkembangan biologi molekuler yang secara umum mencakup manipulasi DNA dan RNA (*Ribonucleic Acid*) telah merambah ke berbagai bidang kehidupan dalam aplikasinya (Muladno, 2002).

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

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

Asosiasi molekul DNA (yang sangat panjang) dengan protein membentuk kromatin. Kondensasi yang padat dari kromatin membentuk kromosom. Kromosom merupakan komponen penting dalam semua sel makhluk hidup, dimana dalam kromosom tersebut terdapat bagian DNA yang mendikte suatu sifat khusus yang disebut dengan gen (Muladno, 2004).

DNA merupakan polinukleotida. Monomernya adalah nukleotida. Setiap nukleotida tersusun oleh tiga komponen, yaitu molekul gula pentosa (*deoxyribose*), gugus fosfat dan basa nitrogen. Dua komponen pertama terdapat disemua nukleotida dengan susunan dan bentuk yang identik, sedangkan komponen ketiga (basa nitrogen) mempunyai susunan dan bentuk yang berbeda didalam satu nukleotida dengan nukleotida lainnya. Basa nitrogen utama DNA adalah Guanin dan Adenin yang merupakan purin serta Sitosin dan Timin yang merupakan pirimidin (Zahir SA, 1990; Jusuf, 2001).

Urutan basa nitrogen yang membentuk DNA inilah yang dapat membedakan antara individu satu dengan individu lainnya, karena urutan atau susunan basa-basa tersebut berbeda antara satu orang dengan orang lainnya (Notosoehardjo, 2001; Murray et al, 1997).

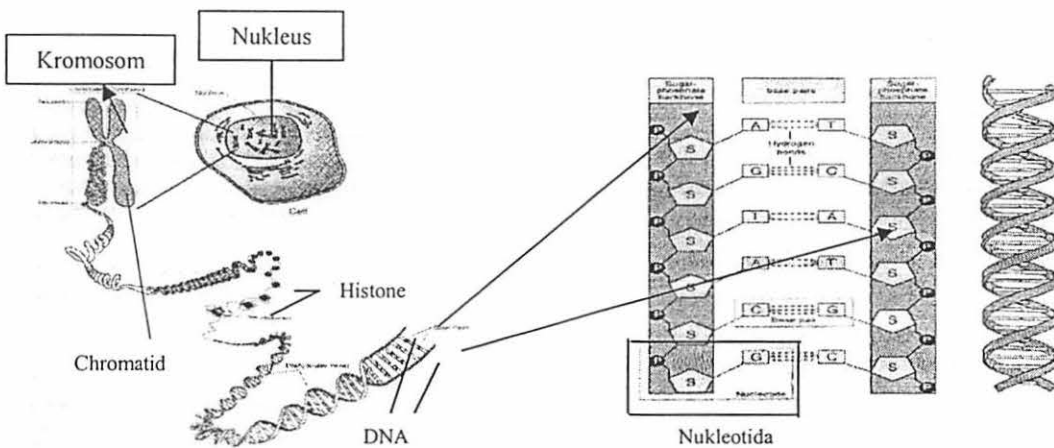
Nukleotida saling berikatan melalui ikatan fosfodiesterase 5'-3'(tanda 'digunakan pada pemberian nomor unsur karbon pada ribose untuk membedakan dari pemberian nomor unsur-unsur pada basa N), antara fosfat pada C₅ dari suatu nukleotida dengan C₃ dari nukleotida lain. Dengan aturan ini, maka pada ujung-ujung rantai polinukleotida akan ditemukan fosfat pada ujung 5' dan radikal OH pada ujung 3'. Basa Adenin (A) selalu berikatan dengan Thymin (T) dari nukleotida lain, sedangkan basa Guanin (G) dengan basa Cytosin (C) nukleotida lain. Adenin

dan timin berikatan dengan dua ikatan hidrogen, sedangkan guanin dan cytosin berikatan dengan tiga ikatan hidrogen hingga lebih stabil. Dengan demikian, ikatan G-C lebih kuat sekitar 50%, karena tambahan kekuatan ini dan juga karena interaksi yang saling bersusun, maka daerah-daerah DNA yang kaya akan ikatan G-C jauh lebih resisten terhadap proses denaturasi (proses pemisahan) daripada daerah-daerah yang kaya akan A dan T (Jusuf, 2001).

Aturan yang membuat perpasangan A-T serta G-C disebut aturan Chargaff. Watson & Crick pada tahun 1953 menyimpulkan bahwa DNA mempunyai struktur helix ganda dengan rincian sebagai berikut :

- 1) DNA disusun oleh 2 rantai polinukleotida yang biasanya berpasangan dengan ikatan hidrogen, dengan aturan perpasangan A-T dan G-C.
- 2) Antara 2 untaian membentuk pasangan anti paralel, yaitu antara kedua untaian terdapat arah berlawanan, ujung 5' P akan berhadapan dengan ujung 3'OH.
- 3) Antara 2 pasangan basa terdapat jarak sebesar 0,34 nm (3,4 A)
- 4) Pasangan 2 untaian DNA membentuk suatu pilinan disekitar suatu sumbu dengan arah pilinan kekanan atau searah jarum jam. Setiap 10 *basepair* (34 A) akan membentuk satu pilinan atau perputaran 360°. Pilinan ini mempunyai diameter 20 A.

Panjang keseluruhan DNA dalam kromosom *haploid* adalah 3000 *Megabasepair* (3×10^9 *basepair*) dengan jarak antara *basepair* dalam DNA helix adalah 0,34 nm (3,4A), sehingga panjang *haploid* DNA jika direntangkan sekitar 1 meter (Connor et al, 1997).



Gambar.2.1, Struktur DNA (dikutip dari 'Perkembangan Mutakhir Deteksi paternitas dengan Teknologi DNA' pidato pengukuhan Guru Besar oleh Soekry Erfan Kusuma,2004)

Bahan DNA pada jaringan tubuh manusia sebagian besar dijumpai pada nukleus atau inti sel. Oleh sebab itu DNA tersebut disebut dengan *nuclear DNA* (*nuDNA*) atau DNA inti atau *core-DNA*(*c-DNA*). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa *c-DNA* manusia tersebar didalam 23 pasang kromosom. *c-DNA* sel anak merupakan gabungan *c-DNA* sel ovum (dari ibu) dan *c-DNA* spermatozoa (dari bapak). Hal ini berakibat, *c-DNA* anak selalu merupakan kombinasi dari *c-DNA* ibu dan bapaknya penurunan bersifat parental, suatu pola penurunan yang kita kenal sebagai hukum Mendel.

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

Sekitar 60.000-70.000 gen terdapat pada DNA manusia. Dari keseluruhan gen tersebut tidak seluruh DNAny menjadi ruas penyandi, hanya bagian DNA yang diapit oleh promotor dan terminator. Promotor ialah segmen DNA yang mempunyai panjang sekitar 40 bp (*basepair*) dan berfungsi sebagai tempat enzim polimerase, sedangkan terminator merupakan segmen DNA tempat berakhirnya proses transkripsi (Jusuf, 2001). Masing-masing gen biasanya hanya mempunyai satu duplikat pada gen haploid dan kelompok duplikat gen ini dan siklus regulasinya berjumlah 70% dari keseluruhan DNA (diprediksi ukuran gen sekitar 30 kb (*kilobase*)). Sisanya 30% dari DNA adalah *repetitive* dan tidak mempunyai fungsi mensintesa protein. *Repetitive* DNA dibagi menjadi *tandem repeat* (*satellite DNA*) dimana pengulangan berurutan satu dengan lainnya secara langsung dan *interspersed repeat* yang muncul sebagai *multiple-copies* tersebar disepanjang DNA (Connor et al, 1997; Jusuf, 2001)

Pada genom manusia diketahui mengandung banyak sekali urutan DNA berulang, yang bervariasi dalam ukuran maupun panjangnya (Sudoyo, 2003). Bagian DNA ini tersebar dalam seluruh genom manusia sehingga merupakan multilokus dan dimiliki oleh semua orang tetapi masing-masing individu mempunyai jumlah pengulangan yang berbeda-beda satu sama lain, maka kemungkinan dua individu mempunyai fragmen DNA yang sama adalah sangat kecil sekali (Kirby, 1990). Selain itu *repetitive* DNA mempunyai sifat : setiap individu tetap dan diturunkan dari orang tua dan bisa ditemukan disekeliling *sentromer* kromosomal (Atmaja, 2005).

Tandem repetitive DNA dibagi menjadi *microsatellit*, *minisatellit* dan *macro-satellit repeat*. Disebut *Microsatellit repeat* bila panjangnya kurang dari 1 kb (*kilobase*) dan *repeat motif* yang sering muncul adalah A, AC, AAAN (dimana N

bisa nukleotida apa saja), AAN dan AG, yang biasanya disebut dengan '*Short Tandem Repeat (STR)*'. *Minisatellite* biasanya sepanjang 1 sampai 30 kb (*kilobase*) dengan mempunyai *repeat motif* lebih panjang daripada *microsatellit repeat* dan sering disebut '*Long Tandem Repeat (LTR)*'. Sedangkan *macro-satellit repeat* mempunyai panjang sampai *megabase* yang ditemukan diujung lengan kromosom (*telomere*) dan *sentromere* (Connor et al, 1997).

Microsatellite repeat sering disebut dengan '*STR (Short Tandem Repeat)*' merupakan daerah DNA dengan unit pengulangan (*repeat motif*) 3 sampai 7 bp (Kusuma, 2004; Butler, 2001). Jadi dengan kata lain, STR adalah *tandem repeat* dengan *repeat motifs* yang amat pendek. Pada setiap lokus STR, setiap individu memiliki 2 fragmen DNA yang masing-masing berasal dari orang tuanya (Notosoehardjo, 2001).

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

Keunggulan dari analisis DNA *fingerprinting* diantaranya karena DNA memiliki kestabilan pada sel somatik yang artinya gambaran DNA dari darah, sperma, rambut, organ dan sebagainya identik, sehingga cocok untuk digunakan sebagai bahan identifikasi (Kirby, 1990).

Analisis DNA *Fingerprinting* antara lain analisis melalui VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) dan RFLP (*Restriction Fragmen Length Polymorphisms*). VNTR analisis adalah pemeriksaan DNA yang didasarkan pada perulangan urutan basa tertentu (*core sequences*), yang berulang dengan jumlah perulangan yang berbeda-beda antara seseorang dengan orang lain. Daerah (*region*) dengan *core sequences* 1 sampai 30 kb (*kilobase*) dikenal istilah '*minisatellite*' atau disebut dengan *long Tandem Repeat* (LTR)s. Sedangkan daerah DNA dengan *core sequences* kurang 1 kb (*kilobasepair*), dikenal dengan istilah '*microsatellite*' atau disebut dengan *Short Tandem Repeat* (STR) (Connor et al, 1997). Oleh karena banyaknya jumlah alel (pengulangan) yang ada, maka setiap alel yang sama relatif jarang ditemukan dalam populasi, sehingga *polimorfisme* ini amat informatif digunakan sebagai pembeda genetik antar individu (Robert, 2005).

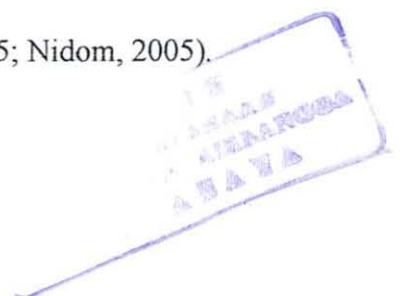
Sejak ditemukan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) oleh Kary Mullis pada tahun 1986, perkembangan biologi molekuler menjadi semakin cepat, terutama dalam dunia kedokteran forensik karena dengan metode PCR ini hanya membutuhkan jumlah DNA yang sedikit. Dengan jumlah DNA yang 'sedikit' tersebut, PCR mampu menggandakan DNA berlipat-lipat jumlahnya, sehingga dapat dilakukan analisis DNA. Dengan memperbanyak DNA jutaan sampai milyaran kali, maka memungkinkan dianalisisnya sampel/specimen forensik yang jumlahnya amat minim, seperti analisis kerokan kuku (cakaran korban pada pelaku), baju korban atau

pelaku, bercak mani, puntung rokok dan sebagainya. Kelebihan lain dari pemeriksaan dengan PCR adalah kemampuannya untuk menganalisis bahan yang sudah terdegradasi sebagian (Kirby, 1990; Atmaja, 2005).

Dengan adanya metode PCR, bagian DNA yang ingin diperbanyak dapat diamplifikasi dengan menggunakan primer yang telah diketahui urutan basanya, sehingga pemeriksaan DNA dengan menggunakan analisis STR ini dapat dilakukan secara mudah dan cepat (Notosoehardjo, 1999b). PCR mampu menggandakan DNA berlipat-lipat jumlahnya untuk kemudian dilakukan analisis sidikjari DNANYa (DNA *fingerprinting*) (Jackson, 1990).

Lokus-lokus pada STR memiliki ukuran alel yang kecil (kurang dari 300 *basepair*), maka dengan PCR akan mudah diamplifikasi dan pada sampel yang mengalami degradasi pun dapat dianalisis (Butler, 2001)

Pada pemeriksaan dengan analisis STR, mengingat DNA merupakan sebuah rangkaian genetik yang sangat panjang, maka pemeriksaan yang dilakukan hanya pada beberapa lokus (daerah) DNA saja. Analisis STR dapat dikerjakan dalam waktu yang lebih singkat daripada analisis RLFP. Sehingga analisis STR tersebut yang paling sering digunakan dalam pemeriksaan identifikasi forensik (Sueblinvong et al, 1999). Disamping itu juga analisis STR merupakan alat yang bagus dan efisien dalam *forensic stain typing* dari kasus kriminal dan paternitas (Waiyawuth et al, 1998). Dari sekitar 13 lokus yang ada pada analisis STR ini, pada beberapa laboratorium hanya memakai paling sedikit 3 lokus (daerah) (Sosiawan et al, 2004). Dengan hanya menggunakan 5 – 6 lokus, maka kemungkinan kesamaan DNA *polymorfisme* antar individu 1 berbanding 100 milyar (Atmaja, 2005; Nidom, 2005).



Di *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga melakukan pemeriksaan paling sedikit pada 7 sampai 8 lokus dengan tingkat *probability* mencapai angka 99,99% (Kusuma, 2004). Atmaja (2005) melakukan pemeriksaan 9 lokus serta lokus Amelogenin dalam kasus paternitas.

2.2. Komponen Bercak keringat

Secara mikroskopis kulit terdiri dari tiga lapisan : epidermis, dermis dan lemak subkutan. Epidermis secara histologi dibagi menjadi beberapa zona (Champion et al, 1992; Fawcet, 2002) :

- a) Lapisan sel basal (*stratum germinativum*)
- b) *Stratum spinosum*
- c) *Stratum granulosum*
- d) *Stratum Lusidum*
- e) *Stratum korneum*

Lapisan basal sebagian besar terdiri dari sel-sel epidermis yang berdiferensiasi yang terus menerus mengalami mitosis, memperbaharui epidermis. Kalau sel ini mengalami mitosis, salah satu sel anak akan tetap berada dilapisan basal untuk kemudian membelah lagi, sedangkan sel yang lain bermigrasi ke atas menuju *stratum spinosum* (Fawcet, 2002).

Sel epidermis utama yang berdiferensiasi adalah *keratinosit* membentuk keratin suatu protein fibrosa. Pada waktu keratinosit meninggalkan lapisan *malfigi* dan bergerak ke atas, maka sel-sel ini akan mengalami perubahan bentuk, orientasi, struktur sitoplasma dan komposisi. Proses ini mengakibatkan transformasi dari sel-sel yang hidup aktif mensintesis menjadi sel-sel yang mati dan bertanduk dari *stratum korneum*, suatu proses yang dinamakan keratinisasi. Modifikasi struktur

selama perjalanan dinamakan *sitomorfosis*, proses ini akan berlangsung 20 sampai 30 hari (Fawcet, 2002). *Keratinosit* dari lapisan basal bentuknya silindris. Sel-sel ini menjadi polyhedral pada waktu berada dalam *stratum spinosum*, menjadi semakin pipih dalam lapisan granular dan menjadi lamelar pada *stratum korneum*. Unsur-unsur sitoplasma juga mengalami perubahan-perubahan yang penting. Proses migrasi sel epidermis yang telah terprogram ini memakan waktu sekitar 28 – 30 hari (Champion et al, 1992)

Dermis terletak tepat dibawah epidermis dan terdiri dari serabut-serabut kolagen, elastin dan retikulin yang tertanam dalam suatu substansi dasar. Adneksa dermis terdiri dari rambut, kuku, kelenjar keringat dan *Sebaceous glands*. *Sebaceous glands* terdapat pada hampir seluruh kulit, kecuali telapak tangan, telapak kaki dan sisi kaki dimana tidak terdapat rambut. Mereka merupakan turunan dari folikel rambut, berdiamter 0,2-2 mm, terletak diatas insersi muskulus *errektor pili* saluran keluarnya bermuara ke bagian sepertiga atas kanal folikel. Sekresi kelenjar sebacea disebut *sebum*, adalah campuran lemak termasuk trigliserida, kolesterol dan substansi mirip lilin. Diduga ia ikut memelihara tekstur lunak kulit dan fleksibilitas rambut (Fawcet, 2002). Ada tiga mekanisme pelepasan produk sekretoris oleh sel (Champion et al, 1992; Fawcet, 2002) :

- a) Sekresi *apokrin* oleh sel epitel, mencakup konstiksi dan pemutusan sebagian sitoplasma apical bersama granul sekresi. Terutama didaerah axial, kulit genital, sekitar puting susu dan perianal, menimbulkan bau pada hasil sekresinya yang mengalami dekomposisi oleh bakteri
- b) Sekresi *merokrin* adalah pelepasan produk dengan membran sel tetap utuh, sehingga sifat sel-sel kelenjar yang membentuk getah tetap utuh .

c) Sekresi *holokrin* terdiri atas pelepasan sel utuhnya atau seluruh sitoplasmanya ke dalam saluran keluar kelenjar, misalnya *Sebaceous glands*.

Sebaceous glands merupakan struktur lobular yang terdiri dari sel-sel yang berisi lemak. Substansi berminyak yang disebut *sebum* disalurkan menuju saluran sentral dan dikeluarkan melalui saluran-saluran *pilosebacea* folikel-folikel rambut. Hasil sekresi kelenjar sebacea merupakan disintegrasi kompleks dari sel glandular pada perifer dari lobus atau acinus kelenjar, dan siklus ini berlangsung rata-rata 7,4 hari (satu minggu) (Champion et.al, 1992). *Sebaceous glands* banyak pada wajah, dada, punggung dan bagian proksimal lengan. Aktivitasnya terutama diatur oleh hormon-hormon androgenik (Guyton, 1995).

Kelenjar keringat (*Sudorifera glands; Sweat glands*) tersebar luas di integumen, merupakan kelenjar tubuler bergelung dengan bagian sekresi terletak di dermis bagian dalam, atau lebih umum disebut *hypodermis*. Saluran langsung naik menembus dermis dan epidermis untuk bermuara pada pori keringat dipermukaan kulit. Secara umum kelenjar keringat dipersarafi oleh serabut-serabut saraf simpatis kolinerjik. Namun demikian, kelenjar ini dapat juga dirangsang oleh epinefrin atau norepinefrin dalam darah walaupun kelenjar itu sendiri disebagian besar tubuh tidak memiliki persarafan adrenergik (Guyton, 1995; Silvia et.al, 1995).

Kelenjar keringat berbentuk tubular terdiri dua bagian: (1). Bagian bergelung disubdermis dalam yang mensekresi keringat, dan (2). Bagian duktus yang berjalan keluar melalui dermis dan epidermis kulit. Bagian sekretorik kelenjar keringat mensekresi cairan yang disebut *secret primer* atau *secret precursor*; kemudian

konsentrasi dari zat-zat dalam cairan tersebut dimodifikasi sewaktu cairan itu mengalir melalui duktus.

Secret precursor adalah hasil sekresi aktif dari sel-sel epitel yang terletak pada bagian gelungan dari kelenjar keringat. Komposisi *secret precursor* mirip dengan yang terdapat pada plasma namun tidak mengandung protein plasma.

Secara normal, orang dalam keadaan tidak beraklimatisasi jarang dapat membentuk keringat lebih dari 700 ml perjam. Ketika terpapar pada cuaca panas satu sampai enam minggu orang berkeringat lebih banyak, seringkali pembentukan keringat meningkat 1,5 sampai 2 liter perjam. Berkeringat diatur oleh sistem saraf otonom. Rangsangan pada area preoptik dibagian anterior hipotalamus baik secara elektrik atau oleh panas yang berlebihan menyebabkan berkeringat. Impuls dari area yang menyebabkan berkeringat ini dipindahkan melalui *pathway* otonom ke medula spinalis dan kemudian melalui *pathway* simpatis ke kelenjar keringat di kulit. Disamping saraf simpatis kolinergik, pada kelenjar keringat terutama pada tangan dan kaki memiliki persarafan *adrenergic*, sehingga dalam keadaan beraktivitas (misal berolahraga) yang secara normal merangsang aktifitas adrenergik yang mengakibatkan pengeluaran keringat meningkat. Selain faktor tersebut, faktor-faktor lain yaitu gerakan udara, jumlah kelembaban dalam udara dan sifat alam disekitarnya juga mempengaruhi produksi keringat.

2.3. STR (*Short Tandem Repeat*) Marker yang umum digunakan

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

Daerah-daerah DNA dengan panjang unit-unit pengulangan (*core sequence*) kurang dari 1 kb (*kilobase*) disebut *microsatellit* atau *short tandem repeat* (STR) atau *simple sequence repeat* (SSR) (Connor et al, 1997; Butler, 2003). STR menjadi penanda pengulangan DNA yang populer karena lokus-lokus STR memiliki ukuran alel yang kecil (kurang dari 1 kb dan rata-rata terbanyak 300 bp) maka dapat diamplifikasi dengan mudah dengan PCR dan sampel yang telah terdegradasi pun dapat dianalisa. Hal ini berkaitan dengan kenyataan bahwa kedua alel dari individu *heterozigot* memiliki ukuran sama karena *core sequencenya* pendek. Jumlah pengulangan dalam penanda STR bisa sangat beragam diantara individu sehingga efektif untuk tujuan identifikasi manusia (Butler, 2001;2003).

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

STR mempunyai beberapa kelebihan jika digunakan sebagai identifikasi forensik yaitu (Butler, 2001;2003; Nidom, 2005) :

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

FBI (Federal Bureau Investigation) telah mendesain 13 lokus sebagai sistem identifikasi forensik nasional dengan bersinergis dengan *Combined DNA Index*

System (CODIS) database, lokus *STR* tersebut meliputi TH01, TP0X, CSF1PO, vWA, FGA, D3S1358, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, D8S1179, D18S51, dan D21S11, ditambah dengan marker *amelogenin* yang digunakan untuk menentukan jenis kelamin korban (Butler, 2003; Kusuma, 2004).

European DNA Profiling Group (EDNAP) dan rekomendasi *European Network of Forensic Science Institute (ENSFI)*, pada pertemuan kerja Interpol tahun 1997, mengemukakan empat standar lokus *STR* yang digunakan, yakni: HUMTH01, HUMVWFA31, D21S11 dan HUMFIBRA/FGA, ditambah dengan lokus D3S21358, D8S117 dan D18S51 (Kusuma, 2004). Sedang lokus *VNTR* yang direkomendasikan dalam pemeriksaan meliputi : D1S80, D17S5, APO-B, D16S83 dan D17S766 (Kusuma, 2004).

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

Lokus-lokus *STR* dibagi empat kategori (Butler, 2001;2003):

1. Pengulangan sederhana yang mengandung satu rangkaian pengulangan: TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D16S539.
2. Pengulangan sederhana dengan alel *non-consensus*: TH01, D18S51, D7S820.
3. Pengulangan campuran dengan alel *non-consensus*: vWA, FGA, D3S1358, D8S1179.
4. Pengulangan kompleks: D21S11

CSF1PO merupakan pengulangan tetranukleotida yang ditemukan dalam *c-fms proto-oncogene* untuk reseptor CSF-1 pada lengan panjang kromosom 5 (5q33.3-34).

Lokus ini berukuran antara 295 – 327 *basepair*. Alel yang umum mengandung pengulangan inti (*core sequence repeat*) T-A-G-A dan rentang alel berukuran 7 hingga 15 (Promega Corp, 2000; Butler, 2003)

Lokus FGA merupakan pengulangan tetranukleotida campuran yang ditemukan dalam intron ketiga dari lokus fibrinogen α manusia pada lengan panjang kromosom 4 (4q28). FGA juga disebut sebagai FIBRA atau HUMFIBRA. Lokus tersebut mengandung pengulangan C-T-T-T. Rentang ukuran alel dari 15 hingga 35 (Butler, 2003).

Sedangkan lokus THO1 merupakan pengulangan tetranukleotida sederhana yang ditemukan dalam intron 1 dari gen *tyrosine hydroxylase* pada lengan pendek kromosom 11 (11p15.5). THO1 memiliki rangkaian sederhana dengan motif pengulangan T-C-A-T. Lokus ini berukuran antara 179 sampai 203 *basepair* dengan variasi alel antara 5 sampai 11 (Promega Corp, 2000; Butler, 2003).

Pada lokus TPOX merupakan pengulangan tetranukleotida sederhana yang ditemukan dalam intron 10 dari gen *thyroid peroxidase* pada lengan pendek kromosom 2 (2p23-pter). Memiliki rangkaian motif pengulangan G-A-A-T. Lokus ini berukuran antara 224 sampai 252 *basepair* dengan variasi alel antara 6 sampai 13 (Promega Corp, 2000; Butler, 2003).

Lokus vWA merupakan pengulangan tetranukleotida campuran yang ditemukan dalam intron 40 dari gen *von Willebrand Factor* pada lengan pendek kromosom 12 (12p12-pter). Memiliki motif pengulangan (T-C-G-T)(T-C-T-A). Lokus ini memiliki rentang ukuran 139 sampai 167 *basepair* dengan variasi alel antara 13 sampai 20 (Promega Corp, 2000; Butler, 2003).

D13S317 merupakan lokus dengan pengulangan tetranukleotida sederhana yang ditemukan pada lengan panjang kromosom 13 (13q22-31). Memiliki motif pengulangan T-A-T-C. Lokus ini memiliki ukuran 165 sampai 197 *basepair* dengan variasi alel 7 sampai 15 (Promega Corp, 2000; Butler, 2003).

Lokus D7S820 merupakan pengulangan tetranukleotida sederhana yang ditemukan pada lengan panjang kromosom 7 (7q11.21-22). Memiliki motif pengulangan G-A-T-A. Lokus ini memiliki rentang ukuran 215 sampai 247 *basepair* dengan variasi alel 6 sampai 14 (Promega Corp, 2000; Butler, 2003).

Sedangkan lokus D16S539 merupakan pengulangan tetranukleotida yang ditemukan pada kromosom 16 (16q24-qter). Memiliki motif pengulangan G-A-T-A. Lokus ini memiliki rentang ukuran 264 sampai 304 *basepair* dengan variasi alel 5,8 sampai 15 (Promega Corp, 2000; Butler, 2003).

Serta lokus D17S5 merupakan *minisatellit* yang direkomendasi pada *identity testing* dan *paternity testing* oleh *European DNA Profiling Group* (EDNAP) dan *European Network of Forensic Science Institute* (ENSFI). Lokus ini terdapat pada kromosom 17p13.3, ukuran 180 sampai 1440 bp, *repeat unit size* 70 bp, *power of discrimination for identity* 1 banding 18 (Notosoehardjo, 2001).

D21S11 yang merupakan pengulangan tetranukleotida kompleks pada kromosom 21. Lokus ini sering digunakan dalam penegakan diagnostik pada kelainan Down sindrom pada anak-anak (Butler, 2003).

2.4. Isolasi DNA bercak keringat

Prosedur isolasi DNA dari bercak keringat pada pakaian adalah sama seperti yang dianut Gill et.al (Kirby, 1990) dan *Federal Bureau Investigation* (FBI) (Promega Gene Print DNA Typing Technical Manual, Promega Corporation).

100 µl sampel cairan (darah, sperma dan lain-lain) rata-rata akan menghasilkan bercak berdiameter 2 cm atau 3/4 inci (Luas lingkaran adalah $3,14 \times r^2$, variasi pada r^2 , dapat menyebabkan lingkaran berdiameter 2 cm dapat berisi spesimen 4 kali lipat jumlah spesimen dalam lingkaran bercak berdiameter 1 sentimeter). Ukuran bercak akan bervariasi tergantung bahan tempat bercak menempel. Bercak berasal dari 100 µl cairan diatas selembat katun tipis mungkin akan berukuran 2 kali lebih besar (Kartika et al, 1997).

Isolasi DNA dari bercak keringat pada pakaian diambil dari bagian kerah, ketiak dan pinggir lengan baju sampel, dimana pada tempat-tempat tersebut intensitas kontak dengan permukaan kulit lebih tinggi sehingga diharapkan kadar DNANYa cukup untuk di *typing*. Secara teoritis kadar DNA yang masih dapat digunakan dalam proses DNA *profiling* mensyaratkan berkadar minimal 20 ng/µl. (Notosoehardjo, 1999b: Gatut et.al, 2004).

Ada 3 senyawa penting dalam metode isolasi DNA (Muladno, 2002):

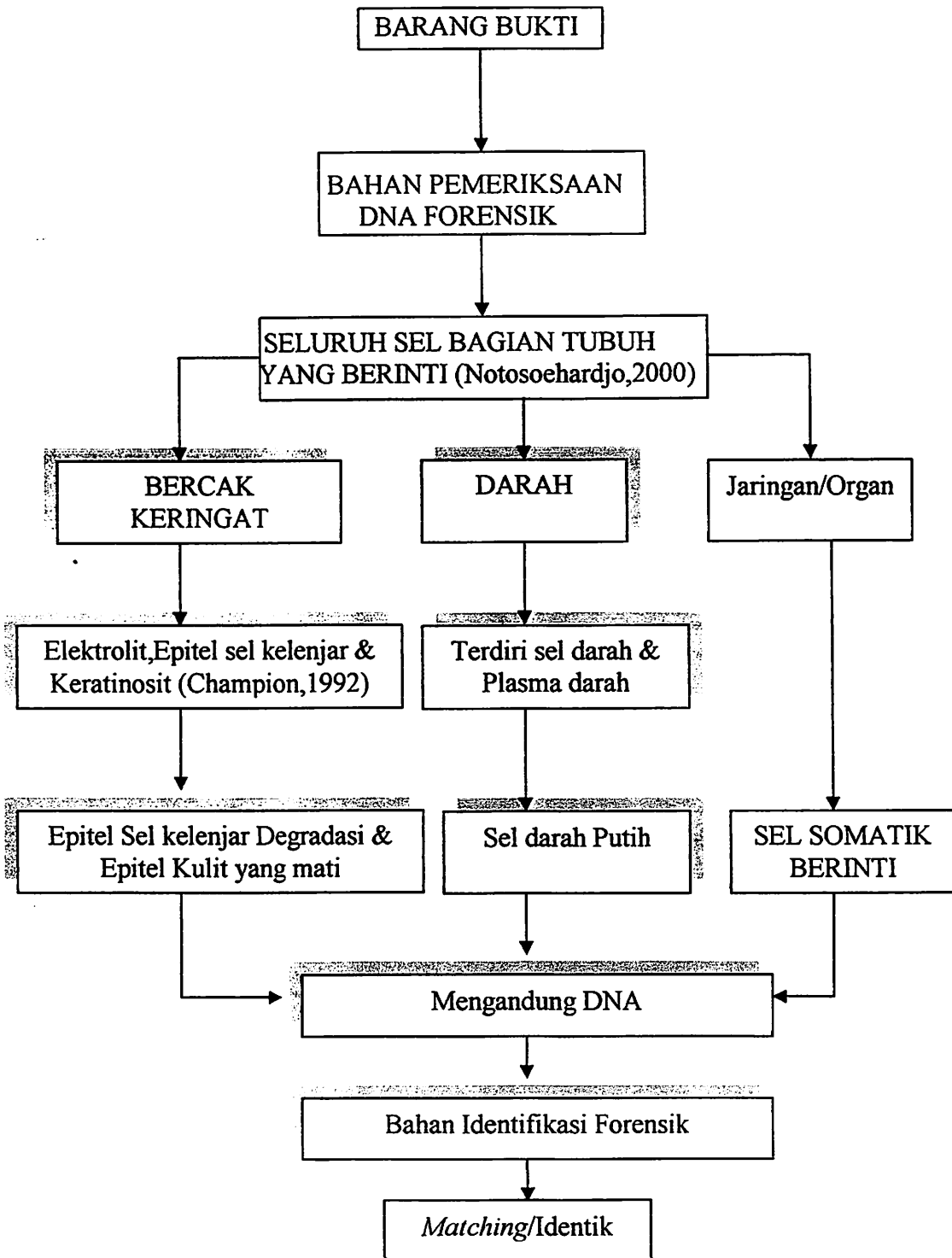
- *Lysis buffer*
- *Digestion buffer*
- *Proteinase K*

Proses penghancuran sel (*lysis*) secara kimia dilakukan dengan memanfaatkan senyawa kimia seperti EDTA (*ethilendiamin tetraasetat*) dan SDS (*sodium dodesil sulfat*). EDTA sebagai perusak/penghancur sel dengan cara mengikat ion magnesium. Ion magnesium ini berfungsi mempertahankan integritas sel dan meningkatkan aktivitas enzim nuklease yang merusak asam nukleat. Sedangkan SDS yang merupakan sejenis deterjen dapat digunakan untuk merusak membran sel.

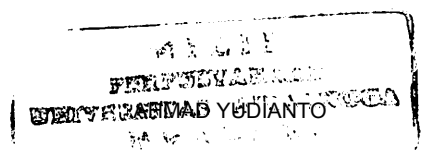
Kotoran (debris) sel yang ditimbulkan akibat proses penghancuran sel dapat dibersihkan dengan cara *centrifuge*, sehingga yang tertinggal disupernatant hanya molekul nukleotida (DNA dan RNA serta protein) (Muladno, 2002). Protein dapat dihilangkan dengan bantuan enzim *proteinase*, sedangkan RNA juga dibersihkan dari larutan dengan RNase, maka DNA dapat diisolasi seutuhnya.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL



□ = yang diteliti.



Setiap tindak pidana pada umumnya meninggalkan barang bukti (*trace evidence*) baik berasal dari korban maupun pelaku. *Trace evidence* merupakan bahan pemeriksaan yang paling bermakna dalam mengungkap menjadi terangnya suatu perkara.

Pada prinsipnya setiap sel somatik berinti manusia dapat diambil sebagai sampel dalam pemeriksaan analisis DNA, karena setiap sel somatik berinti dalam tubuh seseorang memiliki rangkaian DNA Identik (Notosoehardjo, 2003).

Bercak keringat pada pakaian merupakan campuran kandungan sekresi *Sebaceous glands* dan sekresi kelenjar keringat, epitel sel kelenjar dan debris *keratinosit* (Champion et al, 1992; Fawcet, 2002).

Epitel sel kelenjar merupakan hasil degradasi sel kelenjar yang disekresi bersama-sama dengan elektrolit, berasal dari kelenjar Sebacea dan kelenjar keringat. Juga adanya hasil keratinosit dari kulit epidermis. Sel-sel epitel tersebut dapat digunakan sebagai bahan pemeriksian identifikasi forensik.

Hasil isolasi DNA dari bercak keringat pada pakaian dan darah dianalisis melalui lokus TH01,TP0X,CSF1PO,vWA dan D17S5

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian observasional, untuk membuktikan identifikasi personal melalui isolasi DNA dari bercak keringat pada pakaian.

4.2. Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Kelompok Studi *Human Genetic Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga Kampus C Mulyorejo Surabaya.

Waktu Penelitian : bulan November 2005 sampai Februari 2006.

4.3. Sampel dan Besar Sampel

4.3.1. Sampel

Sampel diambil dari bercak keringat pada pakaian sukarelawan dan darah sukarelawan sebagai pembanding.

4.3.2. Besar Sampel

Besar sampel dalam penelitian ini adalah 10 buah sampel.

4.3.3. Kriteria sampel

1. Sampel bercak keringat diambil yang menempel dipakaian sukarelawan dibagian leher (kerah baju), ketiak dan pinggir tepi lengan pakaian yang telah digunakan dalam beraktifitas secara terus menerus selama satu minggu. Pakaian tersebut terbuat dari bahan katun dan belum pernah dilakukan pencucian.
2. Sampel darah dari sukarelawan yang sama sebagai bahan pembanding.

3. Sukarelawan berjenis kelamin laki-laki, usia 30 – 65 tahun dan beraktifitas sebagai pengayuh becak.
4. Kadar DNA hasil isolasi untuk *typing* minimal 20 ng/ μ l (Notosoehardjo, 1999b; Gatut et al, 2004) dan kemurnian DNA 1 – 2 (ideal 1,8 – 2) untuk memungkinkan PCR (Muladno, 2002) .

4.4. Bahan Penelitian

- a. Bercak keringat pada pakaian
- b. Darah dengan EDTA
- c. *DNAzol Reagent*
- d. Larutan 100% *ethanol*
- e. Larutan 70% *ethanol*
- f. *Destilated Water* (Sigma)
- g. PCR Mix
- h. Bis acrylamid
- i. *Agarose*
- j. *Temed*
- k. *Tris Boric EDTA* (TBE) 0,5%
- l. *Marker* 100 bp dan *marker* K562
- m. Primer :

THO1 : 5'-CTGGGCACGTGAGGGCAGCGTCT-3'

5'-TGCCGGAAGTCCATCCTCACAGTC-3'

TPOX : 5'-ACTGGCACAGAACAGGCATCTAGG-3'

5'-GGAGGAACTGGGAACCACACAGGT-3'

CSF1PO : 5'-AACCTGAGTCTGCCAAGGACTAGC-3'

5'-TTCCACACACCACTGGCCATCTTC-3'

vWA : 5'-CCTAGTGGATGATAAGAATAATCAGTATG-3'

5'-GGACAGATGATAAATACATAGGATGGATGG-3'

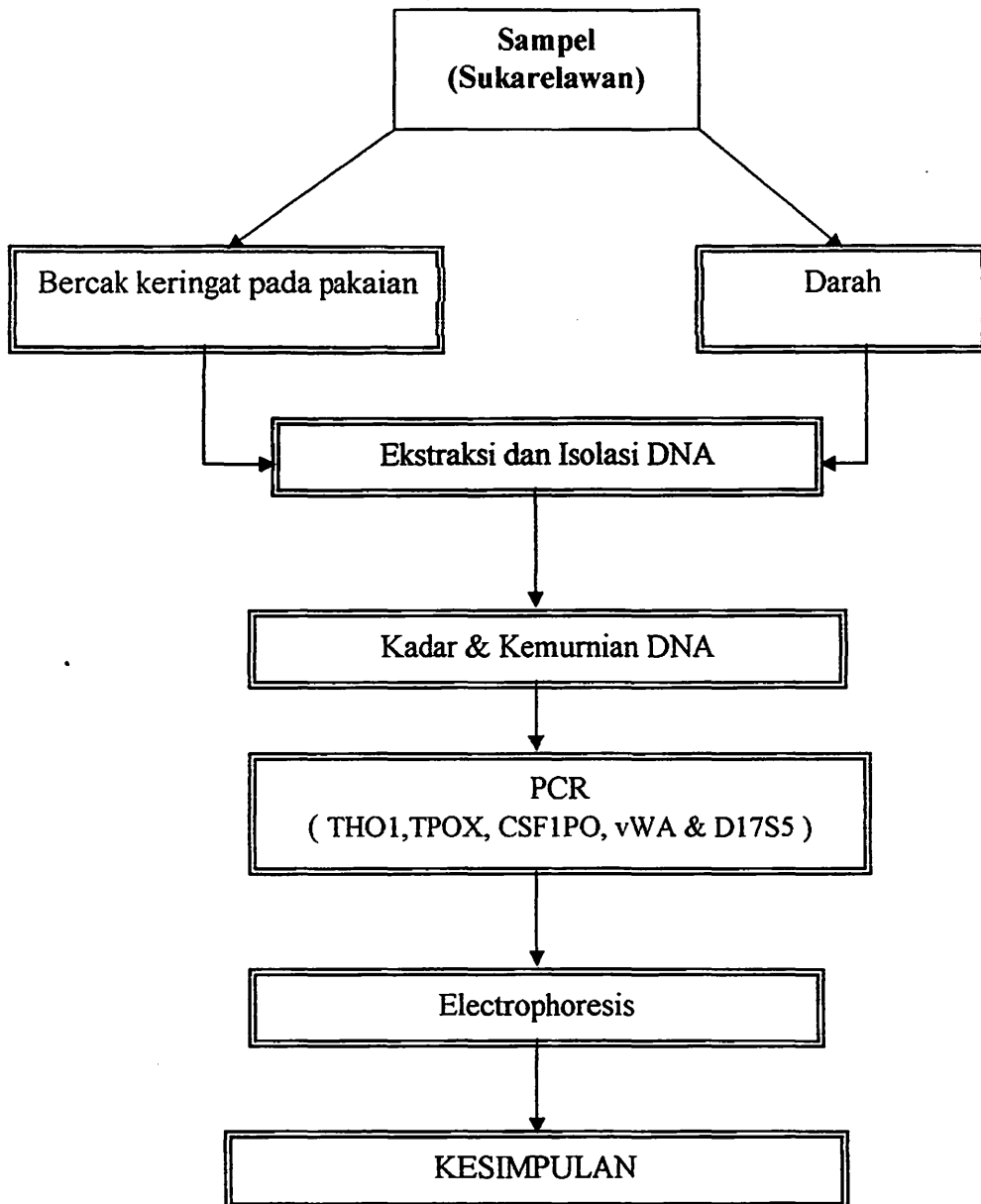
D17S5 : 5'-CGAAGAGTGAAGTGCACAGG-3'

5'-CACAGTCTTATTCTTCAGCG-3'

4.5. Alat Penelitian

- a. *PCR Cycle* (Gene Amp, PCR System 9700, Applied Biosystem)
- b. *Spectrophotometer* (UV-Visible Spectrophometer, Shimatzu)
- c. *Electrophoresis*
- d. *Whirlimixer* (CE)
- e. *Centrifuge* (Himac SCR 20B, Hitachi)
- f. *Micropipet White* (0,5-10 μ l), *yellow* (10-100 μ l) dan *Blue* (100-1000 μ l)
- g. *Tips Micropipet White, Yellow* dan *Blue*
- h. *Transluminator UV*
- i. Kamera polaraid
- j. *Transsonic 310* (Elma)
- k. *Spinator* (Millipore)
- l. Tabung *ependorf* 0,5 cc, 1,5 cc dan 2 cc
- m. *Microwave* (Imarflex)
- n. Timbangan elektrik (Libror EB-3200B, Shimadzu)

4.6. Kerangka Operasional Penelitian



Definisi Operasional :

Yang dimaksud dengan sampel dalam penelitian ini ialah bercak keringat yang menempel pada pakaian dan darah dari sukarelawan. Bercak keringat pada pakaian diambil dari bagian kerah, pinggiran lengan dan ketiak pakaian sukarelawan, sedangkan darah diambil melalui intravena dilengan sukarelawan yang sama.

Isolasi DNA dari bercak keringat pada pakaian dan darah dengan menggunakan *DNAzol reagent*. Hasil isolasi DNA tersebut dilakukan pengukuran kadar dan kemurnian DNANYa. Untuk syarat DNA *profiling* jumlah atau kadar DNA sekitar 20 ng/ μ l untuk *typing* (Notosoehardjo, 1999b; Gatut et al, 2004). Sedangkan kemurnian DNA berkisar antara 1 – 2 (idealnya 1,8–2) untuk memungkinkan dilakukan amplifikasi PCR (Muladno, 2002).

Hasil amplifikasi PCR dilakukan *elektroforesis* untuk menampilkan pita sesuai dengan lokusnya. Lokus THO1 berukuran antara 179 – 203 *basepair*, TPOX antara 224 – 252 *basepair*, CSF1PO antara 295 – 327 *basepair*, vWA antara 139 – 167 *basepair*, dan D17S5 antara 180 – 1440 *basepair*. Visualisasi *elektroforesis* yang berupa pita sesuai lokus berdasarkan *basepair*nya dibandingkan antara bercak keringat dan darah.

Pertimbangan Pemilihan Lokus STR

Lokus STR yang umum digunakan saat ini digolongkan dan dikembangkan dalam laboratorium Dr. Thomas Caskey di Baylor College of Medicine atau *Forensic Science Service* (FSS) di Inggris (Butler, 2003).

Salah satu lokus STR pertama yang dikembangkan oleh *Forensic Science Service* yakni lokus THO1, FES/FPS, vWA dan F13A, dimana memiliki probabilitas kecocokan kira-kira 1 dalam 50 juta (Butler, 2003).

Disamping itu juga lokus THO1, TPOX, CSF1PO, vWA dan D17S5 memiliki kevalidan dalam studi populasi yang pernah dilakukan penelitian sebelumnya dan merupakan sebagian dari 13 lokus STR yang didesain FBI yang bersinergis dengan CODIS *database* serta merupakan standar lokus yang digunakan EDNAP dan rekomendasi ENFSI (Kusuma, 2004). Juga *promega corporation*

melaporkan pada Januari 1997 dan September 1998 untuk lokus THO1, TPOX, CSF1PO dan vWA memiliki *power of discrimination* 1 : 1,2 X 10⁸ (Butler, 2001;2003).

4.7. Cara Kerja :

Kain yang mengandung bercak keringat dari pakaian sukarelawan, potong-potong kecil masukkan pada tabung dan direndam dengan *Distilled Water* (DW) 3-6 ml, di *vortex-sonikasi* sebanyak 3 kali, kemudian di inkubasi selama 24 jam. Selanjutnya potongan kain rendaman diperas, cairan diambil dan *centrifuge* 6500 rpm 30 menit 4⁰C. Supernatan dibuang dan pada pelet dilakukan isolasi DNA dengan DNAzol.

ISOLASI DNA dengan DNAzol Reagent (Invitrogen Tech-Linesm):

1. Pelet dari bercak keringat (atau darah 0,1 ml dari sampel) ditambah 1 ml DNAzol Reagent, keduanya dicampur dengan cara di *vortex*, kemudian inkubasi selama 5 menit pada suhu kamar. Selanjutnya di *centrifuge* 10.000 rpm selama 10 menit temperature 4⁰C, diambil *viscous supernatant* dan dipindahkan tabung baru.
2. Pada tabung baru tersebut ditambahkan 0,5 ml 100% ethanol (*absolute*), di bolak-balik, di inkubasi pada suhu kamar selama 1-3 menit, *centrifuge* 4000 rpm selama 1-2 menit temperatur 4⁰C. Supernatan dibuang dengan hati-hati agar DNA (pelet) tidak ikut terbuang.
3. Pelet dicuci dengan 0,8-1 ml 75% ethanol sebanyak 2 kali dan setiap kali pencucian tabung dibolak-balik sebanyak 3-6 kali

4. Tabung diletakkan pada posisi tegak selama 0,5 – 1 menit, setelah itu ethanol 75% dibuang dengan cara *pipeting* atau *decanting*. Pellet dikeringkan dengan cara membiarkan tabung terbuka selama 5–15 detik.
5. Pelet yang berisi DNA tersebut dilarutkan dengan 25-30µl *Destiled water* (DW), di *vortex* secukupnya, kemudian di simpan pada suhu -20⁰ C.

Tahap selanjutnya adalah dilakukan pengukuran kadar dan kemurnian DNA. Pengukuran jumlah DNA melalui *UV-spectrophotometer* didasarkan pada prinsip iradiasi sinar *ultra-violet* yang diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan. Pemeriksaan ini didasarkan pada banyaknya sinar UV yang diserap oleh larutan DNA, yang berbanding lurus dengan banyaknya DNA dalam sampel. Penyerapan sinar UV secara maksimal oleh DNA dicapai pada panjang gelombang (λ) 260 nm sedangkan penyerapan maksimal oleh protein dicapai pada panjang gelombang (λ) 280 nm.

Penentuan kadar DNA($\mu\text{g/ml}$)= Hasil baca(λ 260) X faktor pengencer X 50 $\mu\text{l/ml}$.
(1 OD(*optical densitas*) = 50 $\mu\text{g/ml}$ untuk *double-strand(ds)*DNA & 40 $\mu\text{g/ml}$ untuk *single-strand(ss)*DNA atau RNA). Kemurnian DNA ditentukan dengan menghitung rasio λ 260 : λ 280. Hasil:1 - 2, bila > 1 mungkin untuk dilakukan PCR (idealnya 1,8-2 untuk DNA).

Prosedur UV Spectrophometer:

1. Tabung *ependorf* baru diisi aquades 690 μl ditambah 10 μl DNA hasil isolasi.
2. Baca hasil UV *Spectrophotometer* untuk λ 260 dan λ 280

PCR Protocol (Promega corp. 2001) dengan menggunakan PCR *master Mix*, *up stream* dan *down stream* primer dari Promega corporation :

a) Amplifikasi PCR untuk THO1 :

Menggunakan tabung *ependorf* (0,5 cc), total volume amplifikasi PCR 25 μ l :

- PCR *master* Mix : 12,5 μ l
- *Up stream* primer THO1 : 2,5 μ l
- *Down stream* primer THO1 : 2,5 μ l
- DNA *template* (<250 ng) : 5 μ l
- *Destiled Water* : 2,5 μ l

Kemudian dimasukkan dalam *PCR Thermal Cyclers* dan distel pada *protocol amplification* nomer 5 untuk lokus THO1 (Gene Amp^r .PCR System 9700 Thermal Cyclers, Promega Corp.2001) :

Tahap I : *Initial denaturation* 96⁰C selama 2 menit

Tahap II PCR :

Siklus 1 (10 kali): *Subsequent denaturation* 94⁰C selama 1 menit

Annealing 64⁰C selama 1 menit

Extension 70⁰C selama 1 menit 30 detik

Siklus 2 (30 kali): *Denaturation* 90⁰C selama 1 menit

Annealing 64⁰C selama 1 menit

Extension 70⁰C selama 1 menit 30 detik

Tahap III : *Hold Step* 4⁰C

b) Amplifikasi PCR untuk TPOX:

Menggunakan tabung *ependorf* (0,5cc), total volume amplifikasi PCR 25 μ l :

- PCR *master* Mix : 12,5 μ l
- *Up stream* primer TPOX : 2,5 μ l
- *Down stream* primer TPOX : 2,5 μ l

- DNA *template* (<250 ng) : 5 μ l
- *Destiled Water* : 2,5 μ l

Kemudian dimasukkan dalam *PCR Thermal Cycller* dan distel pada *protocol amplification* nomer 5 untuk lokus TPOX (Gene Amp^r .PCR System 9700 Thermal Cycller, Promega Corp.2001) :

Tahap I : *Initial denaturation* 96⁰C selama 2 menit

Tahap II PCR :

- Siklus 1 (10 kali) :
- Subsequent denaturation* 94⁰C selama 1 menit
 - Annealing* 64⁰C selama 1 menit
 - Extension* 70⁰C selama 1menit 30 detik
- Siklus 2 (20 kali):
- Denaturation* 90⁰C selama 1 menit
 - Annealing* 64⁰C selama 1 menit
 - Extension* 70⁰C selama 1 menit 30 detik
- Tahap III : *Hold Step* 4⁰C

c) Amplifikasi PCR untuk CSF1FO :

Menggunakan tabung *ependorf* (0,5cc), total volume amplifikasi PCR 25 μ l :

- PCR *master Mix* : 12,5 μ l
- *Up stream primer CSF1PO* : 2,5 μ l
- *Down stream primer CSF1PO* : 2,5 μ l
- DNA *template* (<250 ng) : 5 μ l
- *Destiled Water* : 2,5 μ l

Kemudian dimasukkan dalam *PCR Thermal Cycller* dan distel pada *protocol amplification* nomer 5 untuk lokus CSF1PO (Gene Amp^r .PCR System 9700 Thermal Cycller, Promega Corp.2001) :

Tahap I : *Initial denaturation* 96⁰C selama 2 menit

Tahap II PCR :

Siklus 1 (10 kali) : *Subsequent denaturation* 94⁰C selama 1 menit

Annealing 64⁰C selama 1 menit

Extension 70⁰C selama 1menit 30 detik

Siklus 2 (20 kali) : *Denaturation* 90⁰C selama 1 menit

Annealing 64⁰C selama 1 menit

Extension 70⁰C selama 1 menit 30 detik

Tahap III : *Hold Step* 4⁰C

d) Amplifikasi PCR untuk vWA :

Menggunakan tabung *ependorf* (0,5cc), total volume amplifikasi PCR 25 μ l :

- PCR *master* Mix : 12,5 μ l
- *Up stream* primer vWA : 2,5 μ l
- *down stream* primer vWA : 2,5 μ l
- DNA *template* (<250 ng) : 5 μ l
- *Destiled Water* : 2,5 μ l

Kemudian dimasukkan dalam *PCR Thermal Cyclers* dan distel pada *protocol amplification* nomer 3 untuk lokus vWA(Gene Amp^r .PCR System 9700 Thermal Cyclers, Promega Corp.2001) :

Tahap I : *Initial denaturation* 96⁰C selama 2 menit

Tahap II PCR:

Siklus 1 (10 kali): *Subsequent denaturation* 94⁰C selama 1 menit

Annealing 60⁰C selama 1 menit

Extension 70⁰C selama 1menit 30 detik

Siklus 2 (20 kali):	<i>Denaturation</i>	90 ⁰ C selama 1 menit
	<i>Annealing</i>	60 ⁰ C selama 1 menit
	<i>Extension</i>	70 ⁰ C selama 1 menit 30 detik
Tahap III:	<i>Hold Step</i>	4 ⁰ C

e) Amplifikasi PCR untuk D17S5:

Menggunakan tabung *ependorf* (0,5cc), total volume amplifikasi PCR 25 µl :

- PCR *master Mix* : 12,5 µl
- *Up Stream primer D17S5* : 2,5 µl
- *Down stream primer D17S5* : 2,5 µl
- DNA *template* (<250 ng) : 5 µl
- *Destiled Water* : 2,5 µl

Untuk lokus D17S5 protokol amplifikasi PCR :

Tahap I : *Initial denaturation* 95⁰C selama 4 menit

Tahap II PCR 30 siklus :

Subsequent denaturation 94⁰C selama 30 detik

Annealing 55⁰C selama 30 detik

Extension 65⁰C selama 4 menit

Tahap III : *Additional extension* 65⁰C selama 7 menit

Hold step 4⁰C

Proses selanjutnya setelah amplifikasi, yakni *elektroforesis* dengan *polyacrylamid agarose composit gel* dengan pewarnaan *silver staining*.

Prosedur *Polyacrylamid Agarose Compsosite Gel Elektroforesis* (Edvotek,2001) :

1. Agarose gel dibuat dari 30 cc TBE (*Tris Boric EDTA*) 0,5X dan Agarose (*LE Analytical Grade*) 0,15 gram, dipanaskan dalam *microwave* sampai jernih kemudian didinginkan sampai suhu 50°C.
2. Kemudian ditambah Acrylamid Bis (*N,N'-Methylenebisacrlaide*) 4,5 cc dan Temed (*N,N,N',N'-Tetramethylenediamine*) 15 µl.
3. Selanjutnya ditambahkan APS (*Amonium persulfat*) 100 µl, lalu dituangkan pada cetakan (*Gel bed*), ditunggu sampai dingin/membeku.
4. DNA hasil PCR 12,5 µl dengan *loading buffer* 2 µl dimasukkan dan *dirunning* pada voltase 70 volt selama 2 jam.

Prosedur *Silver Staining Polyacrylamid Agarose Composit Gel* (Edvotek,2001):

1. *Drying* : (methanol 20% + glycerol 2%) dalam 100c aquades selama 5 menit
2. Fiksasi : (ethanol 10%+ acetic acid glycerol 5%) dalam 100 cc aquades selama 20 menit
3. Cuci/bilas dengan aquades 1x dengan cepat
4. *Staining* : AgNO₃ 0,1% dalam aquades 100 cc selama 50-80 menit
5. *Developing* : (NaOH 1,5%+ Formalin 100 µl) dalam 100 cc aquades, lalu dilihat dengan lampu UV sampai terlihat jelas

4.8. Analisis Data

Data berupa visualisasi *elektroforesis* yakni pita DNA yang diperoleh dari bercak keringat pada pakaian dan darah sukarelawan pada lokus tertentu. Kemudian dibandingkan letak alel antara pita DNA bercak keringat dengan darah pada lokus tertentu apakah identik/konsisten/*matching*.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1. Data Hasil Penelitian

Dalam penelitian ini dilakukan pemeriksaan kadar DNA setelah isolasi DNA dari bercak keringat pada pakaian serta kemurnian DNA sebelum dilakukan amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Hasil pemeriksaan kadar DNA dari bercak keringat pada pakaian serta kemurnian DNAnya dapat dilihat dibawah ini :

Tabel 5.1. Kadar dan Kemurnian DNA dari bercak keringat

No Sampel	λ 260	λ 280	Kemurnian (λ 260/ λ 280)	Kadar (ng/ μ l)
1	0,301	0,264	1,139	20,77
2	0,569	0,295	1,928	39,26
3	0,245	0,114	2,149	16,91
4	0,586	0,354	1,655	40,43
5	0,222	0,128	1,734	15,32
6	0,404	0,253	1,501	27,88
7	0,293	0,254	1,153	20,22
8	0,271	0,135	2,007	18,70
9	0,401	0,218	1,839	27,67
10	0,304	0,149	2,040	20,98
			1,714 \pm 0,36	24,814 \pm 8,44

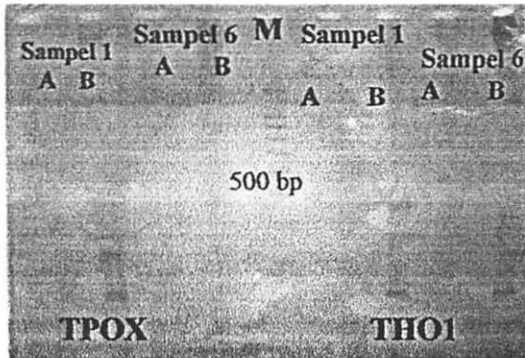
Dari tabel 5.1, terlihat bahwa kadar DNA hasil isolasi dari bercak keringat pada pakaian sampel sangat bervariasi yakni antara rentang 15,32 - 40,43 ng/ μ l.

Secara teoritis kadar DNA tersebut diharapkan masih dapat digunakan dalam proses DNA *profiling*, yang mensyaratkan jumlah atau kadar DNA sekitar 20 ng/ μ l untuk *typing* (Notosoehardjo,1999b: Gatut et al,2004).

Juga kemurnian DNA hasil isolasi dari bercak keringat pada pakaian sampel yang dihitung melalui rasio λ (panjang gelombang) 260 : λ 280. Hasil yang didapat berkisar 1 sampai 2 (idealnya 1,8 - 2), hal tersebut memungkinkan untuk dilakukan amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Muladno,2002). Sehingga dari ketentuan tersebut diatas, hanya 6 sampel yang praktis bisa untuk *typing*, yaitu sampel nomor 1, 2, 4, 6, 7 dan 9.

Visualisasi *elektroforesis* dengan menggunakan *polyacrylamide agarose composit gel* yang berupa pita ditentukan apakah yang muncul lokus THO1, TPOX, CSF1PO, vWA atau D17S5 dengan menarik garis pita dari sampel kearah *marker* 100 bp, lokus THO1 berada antara 179 - 203 bp, lokus TPOX berada 224 - 252 bp, lokus CSF1PO berada antara 295 - 327 bp, lokus vWA berada antara 139 - 167 bp. Selanjutnya pita ditarik kearah kontrol (*marker* K562 sebagai *positive amplication control*) untuk menentukan letak alel apakah berada dibawah atau diatas kontrol. *Marker* K562 dipakai alel *marker* dari *CTT multiplex* dan *FFv multiplex* dari promega corporation 2001. Lokus THO1 dari *marker CTT multiplex* dengan letak alel antara 5-11 (K562 terletak pada alel 9.3, 9.3), lokus TPOX letak alel antara 6 – 13 (K562 terletak pada alel 9.8, 9.8), lokus CSF1PO letak alel antara 7 – 15 (K562 terletak pada alel 10.9,10.9), lokus vWA letak alel antara 13 – 20 (K562 letak alel 16.16, 16.16) dengan perbedaan antar alel 4 bp dan lokus D17S5 ukuran 180 - 1440 bp dengan perbedaan antar alel sebesar 70 bp (K562 letak 250 bp).

Kemudian pita bercak keringat (A) dan darah (B) dibandingkan apakah sejajar (identik/konsisten/*matching*) pada lokus tertentu.



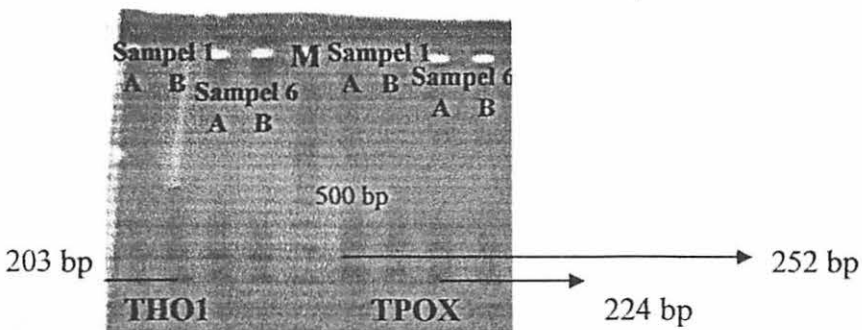
Gambar 5.1. Visualisasi lokus TPOX dan THO1 sampel no 1 dan 6 setelah PCR 1X

A : Bercak keringat

B : Darah

M : Marker Ladder 100 bp

Dari gambar 5.1, pada visualisasi *elektroforesis* pada lokus TPOX dan THO1 pada sampel no 1 dan 6, di mana pita DNA pada bercak keringat (A) samar (tipis) setelah dilakukan amplifikasi PCR satu kali. Kenyataan ini memperkuat adanya DNA pada bercak keringat namun karena sedikitnya jumlah fragmen DNA tertentu (lokus TPOX dan THO1) hasil amplifikasi PCR satu kali, namun pita DNA hanya nampak tipis. Dengan memperhatikan kondisi tersebut diatas, maka diperlukan *second* amplifikasi PCR dengan primer yang sama dari Promega corporation.



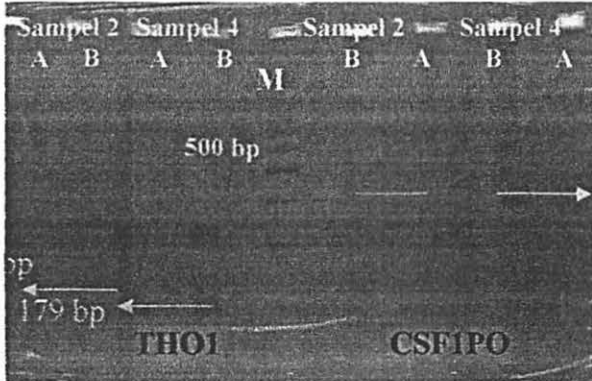
Gambar 5. 2: Visualisasi lokus TPOX dan THO1 pada sampel no 1 dan 6 setelah PCR 2X

M : Marker ladder 100 bp

A : Bercak keringat

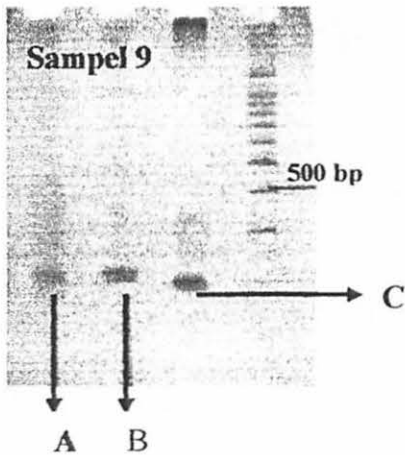
B : Darah

Gambar 5.2, menunjukkan hasil visualisasi *elektroforesis* pada lokus TPOX dan THO1 sampel no 1 dan 6 setelah *second* amplifikasi PCR DNA pada bercak keringat dengan menggunakan primer yang sama pada *first* amplifikasi PCR dari Promega corp., di mana memperlihatkan pita DNA yang sangat jelas pada bercak keringat (A) dan identik/ konsisten/*matching* dengan DNA darah pada alel yang sama.



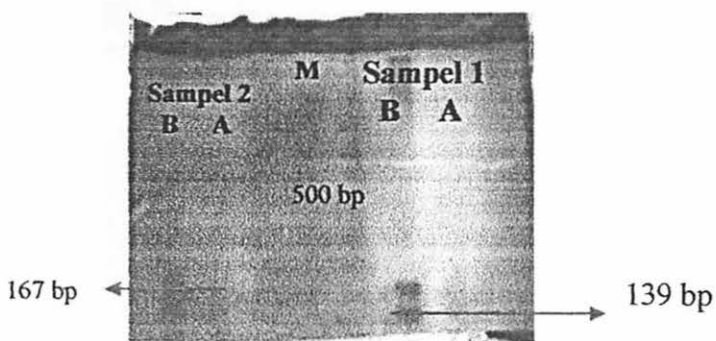
Gambar 5.3. Visualisasi lokus THO1 & CSF1PO pada sampel no 2 dan 4 setelah PCR 2 x
M : Marker ladder 100 bp
A : Bercak keringat
B : Darah

Gambar 5.3, menunjukkan hasil visualisasi *elektroforesis* pada lokus THO1 dan CSF1PO sampel 2 dan 4 setelah *second* amplifikasi PCR DNA bercak keringat dengan primer yang sama, pita DNA yang dihasilkan menunjukkan identik/konsisten dengan DNA darah pada alel yang sama baik pada lokus THO1 maupun pada CSF1PO.



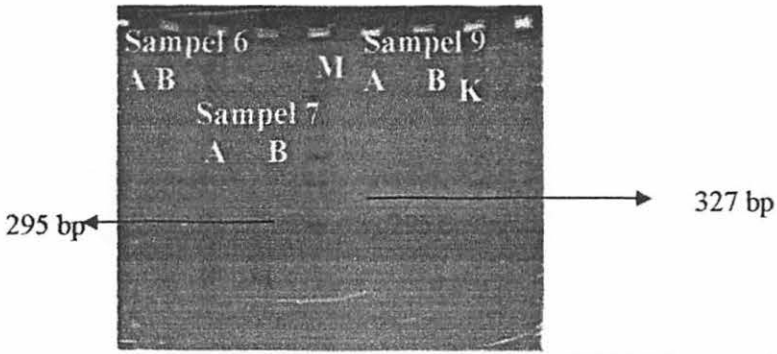
Gambar 5.4, Visualisasi lokus THO1 pada sampel no 9 setelah 2X PCR
 A. Bercak keringat (alel 10.10)
 B. Darah (alel 10.10)
 C. K562 adalah *positive amplification control* (untuk THO1 pada 9.3, 9.3)
 M. Marker ladder 100 bp

Pada gambar 5.4, menunjukkan hasil visualisasi *elektroforesis* lokus THO1 sampel no 9, di mana pita DNA dari bercak keringat (A) dan darah (B) yang letaknya diduga identik/konsisten yang terletak pada alel 10.10;10.10 dengan control K562 (alel 9.3;9,3)



Gambar 5.5, Visualisasi lokus vWA pada sampel no 1 dan 2, 2X PCR
 A. Bercak keringat
 B. Darah
 M. Marker ladder 100 bp

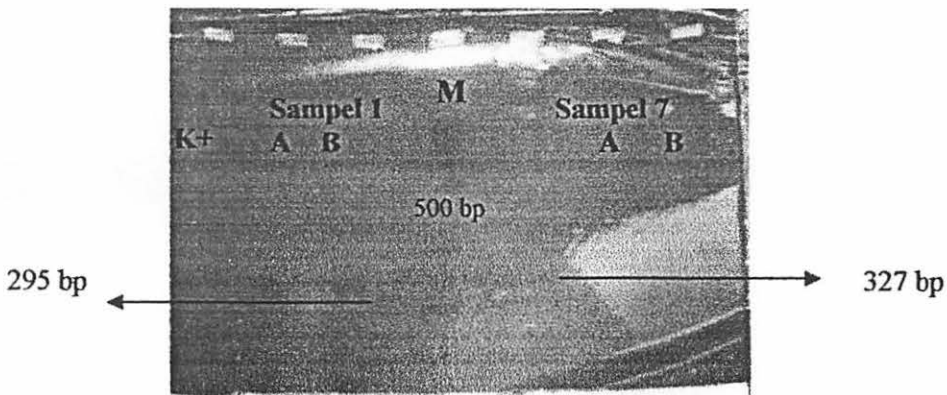
Gambar 5.5, menunjukkan gambaran visualisasi lokus vWA pada sampel no 1 dan 2, di mana nampak pita pada DNA bercak keringat samar/remang dan identik atau konsisten dengan pita pada DNA darah.



Gambar 5.8, Visualisasi Lokus CSF1PO sampel no 6, 7 dan 9

A :Bercak keringat
 B : Darah
 M : Marker ladder 100 bp
 K : Kontrol positif (K562)

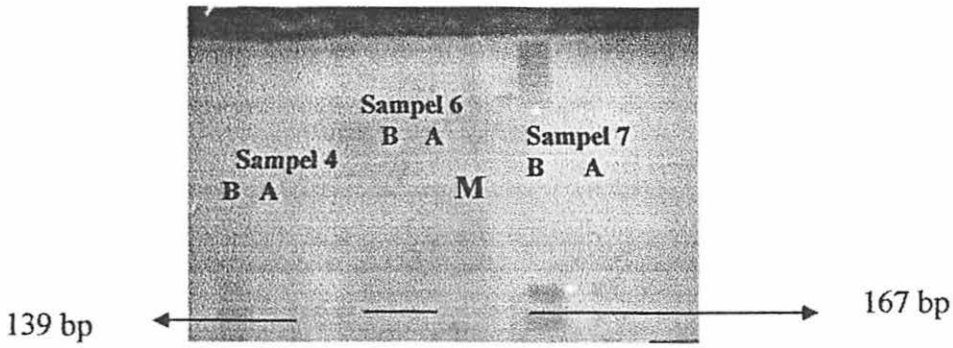
Gambar 5.8, menunjukkan gambaran visualisasi lokus CSF1PO pada sampel no 6, 7 dan 9 setelah *second* amplifikasi PCR dengan menggunakan primer yang sama, di mana nampak pita pada DNA bercak keringat identik atau konsisten dengan pita pada DNA darah.



Gambar 5.9, Visualisasi Lokus CSF1PO sampel 1 dan 7

A : Bercak Keringat
 B : Darah
 M : Marker ladder 100 bp
 K : Kontrol positif (K562)

Gambar 5.9, menunjukkan gambaran visualisasi lokus CSF1PO pada sampel 1 dan 7 setelah *second* amplifikasi PCR dengan menggunakan primer yang sama, di mana nampak pita pada DNA bercak keringat identik atau konsisten dengan pita pada DNA darah.



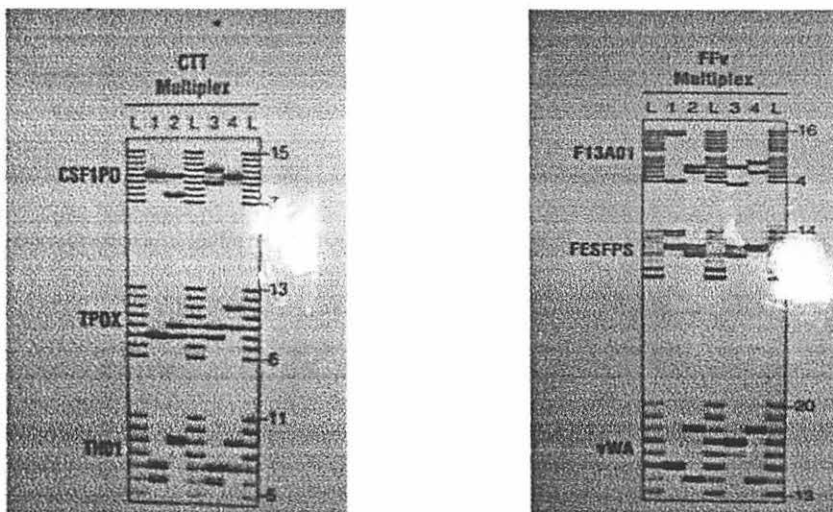
Gambar 5.10, Visualisasi Lokus vWA sampel 4,6 dan 7

A : Bercak Keringat

B : Darah

M : Marker ladder 100 bp

Gambar 5.10, menunjukkan gambaran visualisasi lokus vWA pada sampel 4,6 dan 7 setelah *second* amplifikasi PCR dengan menggunakan primer yang sama, di mana nampak pita pada DNA bercak keringat identik atau konsisten dengan pita pada DNA darah.



Gambar 5.11, Marker *CTT Multiplex* dan *FFv multiplex* dari Promega corp.2001.

Gambar 5.11, menunjukkan gambaran letak alel berdasarkan untuk lokus CSFIPO, THO1, dan TPOX menggunakan alel *marker CTT multiplex* sedangkan vWA menggunakan alel *marker FFv multiplex* dari Promega corporation.

5.2. Analisis Hasil Penelitian

Dari 10 sampel yang digunakan dalam penelitian ini, ternyata hanya 6 sampel yang memenuhi syarat untuk digunakan sebagai *typing*, berdasarkan pengukuran dan kemurnian DNAny. Dimana secara teoritis kadar yang memungkinkan untuk bisa digunakan sebagai bahan *typing* minimal 20 ng/ μ l, sedangkan kemurnian yang memungkinkan untuk dilakukan PCR dengan nilai antara 1 sampai 2 (idealnya 1,8-2) (Notosoehardjo,1999b; Gatut, 2004).

Tabel 5.2, Hasil Pembacaan visualisasi *elektroforesis* antara bercak keringat dengan darah sampel pada lokus CSF1PO, THO1, TPOX dan vWA.

No	Sampel	Lokus CSF1PO	Lokus THO1	Lokus TPOX	Lokus vWA
1	Bercak Keringat	Identik	Identik	Identik	Identik
	Darah				
2	Bercak Keringat	Identik	Identik	Identik	Identik
	Darah				
3	Bercak Keringat	Identik	Identik	Identik	Identik
	Darah				
4	Bercak Keringat	Identik	Identik	Identik	Identik
	Darah				
5	Bercak Keringat	Identik	Identik	Identik	Identik
	Darah				
6	Bercak Keringat	Identik	Identik	Identik	Identik
	Darah				

Dari tabel 5.2, pada 6 sampel dalam penelitian ini yang dilakukan pemeriksaan melalui DNA *profiling* pada lokus THO1, TPOX, CSF1PO dan vWA ternyata DNA hasil isolasi dari bercak keringat yang menempel pada pakaian identik

dengan DNA hasil isolasi dari darah pada sukarelawan yakni pada gambaran visualisasi *elektroforesisnya* memberi gambaran pitanya dan letak alel yang sama.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian tentang bercak keringat sampai saat ini belum banyak dilakukan, sehingga masih banyak yang belum terungkap terutama sebagai bahan identifikasi forensik. Yamamoto K (1996) meneliti puntung rokok sebagai bahan identifikasi forensik, Sadad A.R et.al (2004) mengadakan penelitian tentang kandungan mtDNA dan cDNA dalam kencing (urine). Kesay W et.al (2000) dan Peter PB (2004) melaporkan tentang identifikasi melalui keringat yang melekat pada barang bukti dengan pemeriksaan sidik jari, Seo Y et al (2002), melakukan penelitian identifikasi forensik melalui bahan serumen yang melekat pada *earphone* yang digunakan oleh pelaku perampokan di Jepang. Sosiawan A et al (2004), melakukan penelitian efektifitas serumen sebagai bahan pemeriksaan paternitas.

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa dari isolasi DNA yang berasal bercak keringat pada pakaian melalui amplifikasi PCR adalah identik atau konsisten seperti halnya amplifikasi PCR dari darah pada satu individu.

Sehingga pada dasarnya bercak keringat pada pakaian dapat menjadi bahan alternatif dalam identifikasi forensik, sebagaimana yang sering terjadi pada kasus-kasus forensik dengan sampel-sampel yang berasal dari darah, *vaginal secretions*, *scraping* kulit, maupun dari sumber lainnya (Thompson and Ford, 1991).

Hal tersebut tidak terlepas dari peran bercak keringat sebagai bahan yang diduga mempunyai andil besar dalam menyediakan DNA yang bersumber dari sel-sel epitel kulit (epidermis) dan sel-sel kelenjar sebacea (*sebaceous glands*) (Champion, 1992). Jumlah bercak keringat itu sendiri banyak ditentukan oleh faktor

jumlah sekresi kelenjar keringat dikulit dan lama pakaian digunakan. Pada orang beraktifitas (misal berolahraga) atau terpapar pada cuaca panas satu sampai enam minggu, jumlah keringat lebih banyak, bisa mencapai meningkat 1,5 sampai 2 liter perhari (Guyton,1994). Disamping itu juga aktifitas menyebabkan rangsangan *adrenergic* yang menimbulkan sekresi keringat meningkat dan faktor gerakan udara, jumlah kelembaban dalam udara dan lingkungan sekitarnya juga mempengaruhi produksi keringat (Guyton, 1994; Gibson, 2003).

Faktor- faktor tersebut diatas dapat mempengaruhi jumlah bercak keringat yang melekat pada pakaian yang secara langsung mempengaruhi terhadap jumlah kadar DNA yang dihasilkannya, di mana secara teoritis menurut Notosoehardjo (199b) dan Gatut et al (2004) menganjurkan sedikitnya kadar DNA untuk *typing* adalah 20 $\mu\text{g/ml}$.

Dari 10 sampel bercak keringat yang diambil di baju pada bagian kerah, ketiak dan pinggir lengan, hanya 6 sampel sampel yang kadar DNANYA > 20 ng/ μl sehingga memungkinkan untuk *typing*. Kadar DNA dari bercak keringat mempunyai kesamaan dengan kadar DNA pada urine dengan rata-rata kadarnya: 1 – 20 ng/ μl (DNA Tech. in Forensic Scienc, 1992).

Sedikitnya kadar DNA (kadar < 20 ng/ μl) yang diperoleh pada sampel tersebut dimungkinkan karena bercak keringat yang melekat pada pakaian sedikit atau sel-sel epitel kulit dan sel-sel kelenjar yang terlepas lalu melekat dipakaian hanya sedikit, atau waktu pengambilan sampel pada pakaian hanya terfokus pada satu dua tempat dan disamping itu faktor degradasi dari DNA akibat faktor eksternal (Chen L et al, 2000).

Secara teoritis bahwa degradasi DNA yang dijumpai pada sampel-sampel pemeriksaan DNA pada faktor eksternal dibagi menjadi 2 tipe (Chen L et al, 2000) :

- Tipe I : DNA terdegradasi karena faktor waktu yang relative lama, di mana kerusakan DNA yang terjadi seringkali disebabkan proses kimiawi dan biasanya proses ini berlangsung lamban.
- Tipe II : DNA terdegardasi yang cepat, hal ini disebabkan oleh faktor kelembaban, sinar matahari bahkan oleh suhu ekstrim tinggi

Kemurnian DNA juga menjadi persyaratan dalam pemeriksaan *typing*, di mana kemurnian DNA 1 – 2 (ideal 1,8 - 2) memungkinkan dilakukan amplifikasi PCR. Adanya nilai kemurnian yang melebihi 2 pada penelitian ini, kemungkinan karena kesalahan teknis dari peneliti waktu pengambilan supernatan pada tahapan isolasi DNA sehingga adanya protein tersedot yang menyebabkan terkontaminasi.

Menurut Muladno (2002), secara teoritis untuk mendapatkan hasil visualisasi yang adekuat dibutuhkan kemurnian DNA yang adekuat dan kadar DNA yang memadai, sehingga DNA dapat digunakan sebagai bahan pemeriksaan DNA termasuk dalam hal ini adalah identifikasi dan tes paternitas.

Dengan rendahnya kadar DNA yang didapat dari isolasi dari bercak keringat pada pakaian, secara langsung akan mempengaruhi hasil visualisasi elektroforesis, di mana band DNA pada bercak keringat nampak remang (samar). Hal ini terkait dari jumlah fragmen –fragmen DNA lokus tertentu hasil amplifikasi PCR masih sedikit, sedangkan bila dilakukan *second amplication PCR* dengan primer yang sama pada *first amplication PCR* nampak lebih jelas pita dari DNA bercak keringat dan identik/konsisten dengan pita dari DNA darah.

Berdasarkan kenyataan tersebut, dapat diberikan kesimpulan sementara bahwa pada barang bukti (*trace evidence*) tertentu perlu diperhatikan seperti bercak keringat pada pakaian, karena cukup berarti dalam alternatif identifikasi, meskipun diperlukan teknik amplifikasi PCR yang cermat untuk mendapatkan visualisasi yang jelas.

Sebagai kontrol/pembanding pada penelitian adalah darah, di mana darah mempunyai kadar rata-rata DNA: 20.000-40.000 ng/ml, sehingga sangat efektif sebagai pembanding/control, walaupun menimbulkan rasa ketidaknyamanan dalam pengambilannya namun mempunyai nilai kontaminasi yang minimal sekali. Pada kondisi tertentu bagian tubuh yang lain bisa digunakan sebagai pembanding, misalnya *buccal swab*, urine, tulang, otot dan lain sebagainya, di mana setiap sel pada satu individu adalah konsisten dan bersifat kekal DNANYA (Notosoehardjo, 1999b; Atmaja, 2005). Jikalau pada kondisi lain pembanding bisa diambil dari lain individu yang mempunyai kekeraban (misal saudara kandung, orangtua dll) untuk DNA inti yang pola genetiknya sebagian besar mengikuti hukum Mendel, sedangkan pada pemeriksaan mtDNA yang mempunyai hubungan *maternalis* (Notosoehardjo, 2001).

Penelitian ini menggunakan analisis STR, karena pada umumnya sampel-sampel forensik yang dilakukan pemeriksaan DNA, 40% sudah mengalami degradasi atau kontaminasi (Notosoehardjo, 1999b). Sehingga dengan analisis *Short Tandem Repeat* (STR) yang mempunyai *core sequences* kurang 1 kb (*kilobase*) sangat efektif dan nilai keberhasilannya cukup tinggi, terutama pada DNA yang mengalami degradasi akan terfragmented (terpotong-potong) dengan menghasilkan fragmen yang pendek-pendek.

FBI bersinergis dengan CODIS telah mendesain 13 lokus STR untuk sebagai rekomendasi dalam pemeriksaan identifikasi forensik atau paternitas (Kusuma, 2004). Mengenai syarat minimal jumlah lokus STR yang digunakan untuk pemeriksaan sampai saat ini belum ada kesepakatan. Ada beberapa laboratorium mensyaratkan minimal 3 lokus untuk pemeriksaan paternitas atau identifikasi DNA, di TDC Universitas Airlangga melakukan 7 - 8 lokus (Kusuma, 2004), sedang di Jakarta (Atmaja, 2005) melekukan 9 lokus ditambah lokus *Amelogenin* dalam *paternity test*. Nidom (2005), mengatakan 5 sampai 6 lokus STR memiliki nilai perbandingan 1 : 100 milyar. Sehingga pada prinsipnya mengenai jumlah lokus yang diperiksa adalah semakin banyak lokus yang digunakan pemeriksaan semakin baik nilai akurasinya.

Analisis STR pada penelitian ini direncanakan menggunakan lokus THO1, TPOX, CSF1PO, vWA dan D17S5. Ketepatan penelitian pada lokus THO1, TPOX, CSF1PO, vWA dan D17S5 telah dilaporkan pada beberapa penelitian antara lain: populasi kromosom dan sekuen alel pada lokus THO1 (Van Oorshot, 1996), populasi di Thailand dengan 8 lokus STR termasuk THO1, TPOX, CSF1PO dan vWA (Sueblinvong T et al, 1999) serta penelitian Chang - En Pu (1998) populasi warga cina di Taiwan dengan STR, penelitian A.Foreman et al (1998) variasi genetik dalam Caucasia, Ching - Mei et al (1999) meneliti variasi genetik pada populasi warga Philipina dan Thailand yang tinggal di Taiwan menggunakan 9 lokus STR. Sedangkan di Indonesia, Novita (2005) meneliti pola alel THO1 pada populasi Batak di Surabaya dan Kusuma (2002) populasi lokus D1S80 dan D17S5 di Surabaya. Metode *typing STR loci* terutama THO1 merupakan metode yang masuk akal, kuat

dan efisien sehingga merupakan metode yang bermanfaat pada kasus-kasus forensik (Van Oorschot, 1996).

Namun pada penelitian ini yang diperiksa hanya 4 lokus dan lokus D17S5 tidak dilakukan pemeriksaan. D17S5 merupakan '*minisatellit repeat*', di mana *core sequences* antara 1 – 30 kb (*kilobase*). Karena sisa jumlah DNA yang didapatkan dari bercak keringat sedikit/minimal, sehingga untuk amplifikasi pada D17S5 tidak memungkinkan.

Meskipun demikian pada penelitian ini karena keterbatasan yang ada, masih belum dapat membuktikan seberapa besar pengaruh faktor luar (misal pencucian, atau kelembaban) terhadap isolasi DNA dari bercak keringat pada pakaian.

Untuk itu, dibutuhkan penelitian lanjutan untuk menjawab pertanyaan tersebut. Hal ini dimaksud agar dapat diperoleh gambaran yang menyeluruh, berkaitan dengan kemampuan bercak keringat yang ada pada pakaian sebagai bahan identifikasi forensik.

BAB 7

PENUTUP

7.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini ternyata bahwa isolasi DNA dari bercak keringat pada pakaian dapat menjadi bahan alternatif dalam identifikasi forensik. Umumnya isolasi DNA dari bercak keringat mendapatkan kadar atau kuantitas DNANYa rendah atau bahkan kurang, sehingga diperlukan teknik amplifikasi PCR yang rata-rata lebih dari satu kali amplifikasi. Pada penelitian ini menggunakan lokus THO1, TPOX, CSF1PO, vWA sebagai bahan amplifikasi, dimana keempat lokus tersebut antara bercak keringat dan darah sebagai bahan pembanding adalah identik/konsisten/*matching*. Pada kondisi tertentu sebagai bahan pembanding dapat diambil dari seluruh sel yang berinti pada bagian tubuh satu individu atau dari lain individu yang mempunyai hubungan kekerabatan dekat (keturunan) misal saudara (kakak-adik) dan orang tua .

Sebagai kesimpulan dari penelitian ini adalah bercak keringat pada pakaian dapat sebagai salah satu bahan alternatif identifikasi forensik melalui pemeriksaan forensik molekuler.

7.2. Saran

Untuk kesempurnaan dari hasil penelitian ini maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh-pengaruh perlakuan atau faktor lingkungan pada bercak keringat di pakaian sebagai bahan identifikasi forensik melalui teknik-teknik molekuler forensik.

DAFTAR PUSTAKA

- Affoed R L and Caskey C T, 1994, DNA analysis in Forensic disease and animal identification. *Curr.opin.Biotech.*5:29-32
- Albert B et al, 1994, Molecular biology of the cell, 3rd ed. New York, Garland Publishing
- Anonim, DNA Profiling Enhancement of latent Marks – Chemical Methodes, <http://A:\dna.html>. Tanggal 29 Desember 2005, 20.00 wib
- Anonim, DNA Extraction Methods. <http://www.soton.ac.uk/~kpa/molecol/10html>. Tanggal 29 Desember 2005, 20.00 wib
- Anonim, 2001, PCR based VNTR human DNA typing, The biotechnology Education Company, Edvotek USA,
- Atmaja D S, 2005, Peranan Sidik jari DNA dalam Bidang Forensik, Seminar Nasional Aplikasi DNA Finger Printing dalam Bidang Kedokteran, 29 Agustus 2005, PŞ Bioteknologi UGM
- Becker et al, 2003, The World of The Cell, 5th Edition, Benjamin Cummings, San Francisco Boston New york.
- Brown T A, 1991, Pengantar Kloning Gena, Yayasan essentia medica, 1991.
- Budianto E, 2001, Biostatistika untuk kedokteran dan kesehatan masyarakat, Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Butler J M, 2001, STR Analysis for human testing, STR Typing current protocols in Human Genetic Unit. 14.8, pp 1-37
- Butler J M, 2003, Forensic DNA Typing, Academic Press, Sandiego-Florida, pp 28-30, pp 59-96.
- Chen L et al, 2000, Influence exerted by environmental and physicochemical factors on the results of sex identification of human dental pulp by PCR, *Forensic Sci*, May; 45(3):589-96
- Connor M and Ferguson-Smith M, 1992, Essential Medical Genetics, Fifth edition, Blakwell Sciene Ltd, Australia, pp 3 - 29
- Cooper M G, Hausman Robert E, 2004, The Cell A Molecular Approach, Third Edition, ASM Press Washington, DC.
- Cowger J F, 1983, Friction Ridge Skin : Comparison and Identification of Fingerprints, New York.

- Champion R H, 1992, *Texbook of Dermatology*, Blackwell Scientific Publications, pp1699-1712
- Davis L G et al, 1986, *Basic Methodes in Molecular Biology*, Elsevier, New York
- Fawcet D W, 2002, *Histology*, Edisi 12, Penerbit Buku Kedokteran, EGC Jakarta
- Gatut S and Ujinaka T, 2004, Pengaruh waktu terhadap kualitas dan kuantitas DNA Forensik : Sampel Whole Blood tanpa zat antikoagulan, dalam bunga rampai Ilmu Kedokteran Forensik & Medikolegal, KONAS III PDFI, Semarang, 23-24 Juli 2004.
- Guyton A C, 1994, *Texbooks of Medical physiology*, 7nd. W.B.Saunders Co.pp 183-184
- Gibson J, 2003, *Modern Physiology and Anatomy For Nurses*, 1st ed. Published by Arrangement with Blackwell Science Limited, Oxford, pp 238-239.
- Hammond HA and Caskey CT, 1994, Human DNA fingerprinting using STR loci, *Methodes Mol.Cell.5:78-86*
- Henry A E, 1992, *PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification*, W.H.Freeman and Company, New York.
- Houk M H, 2001, *Mute Witnesses Trace Evidence Analysis*, Academic Press, Tokyo, pp 87-117
- Idries, A.M, 1997, *Pedoman Ilmu Kedokteran Forensik*, Edisi pertama, Jakarta, Penerbit Binarupa Aksara.
- Jackson M K, 1990, *The Polymerase Chain Reaction, Simposium DNA Probing : Teknik dan Penerapan Klinis*, HKKI.
- Jusuf M, 2001, *GENETIKA I Struktur & Ekspresi Gen*, Sagung Seto, Jakarta
- Kartika P and Indrayana NS, 1992, Serologi Forensik, *Pro Justisi Majalah Ilmu Kedokteran Forensik Surabaya Vol VI No.2. Juni* , hal 7-28.
- Kesey W and Alice M, 2000, The Critical stage of Friction Ridge and patern formation, *Silver State Journal of Forensic Identification*, Vol.8,issue 1
- Kirby L T, 1990, *DNA Fingerprinting-An Introduction*, Stokton Press, New York,.
- Kusuma S E, 2000, Polyacrilamide agarose composit gel based system for separation of Short Tandem Repeat Loci, *Folia Medica Indonesia*, XXXVI April-June .pp 5-8.

- Kusuma SE, 2002, Polyacrilamide agarose composite gel based system for separation of STR and VNTR loci to Identify a Korean woman in bali bomb accident, *Folia Medica Indonesia*, XXXVIII oktober-December, pp 253-255.
- Kusuma SE, 2004, Perkembangan mutakhir deteksi paternitas dengan tehnologi DNA, Pidato pengukuhan guru besar Ilmu Kedokteran Forensik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya.
- Lewin, 2004, Genes VIII, International Edition, Pearson Education, Inc.
- Lewis R, 2001, Human Genetics Conception and Application, 2nd Ed Wm.C.Brown Publishers, Toronto, pp139-180.
- Mark A.F, et al, 1991, Forensik DNA Technology, Lewis Publishers inc.
- Murray et al, 1997, Biokimia Harper, edisi 24, EGC, hal 366-370
- Muladno, 2002, Seputar tehnologi rekayasa genetik, Edisi pertama, Bogor, Pustaka.
- Nidom C.A, 2005, Teknik Biomolekuler untuk Penentuan 'DNA Profil', Kumpulan makalah seminar sehari tentang Tes Paternitas ditinjau dari berbagai aspek, TDC UNAIR, November 2005.
- Noble D, 1995, Forensic PCR : Primed, Amplified, and Ready for Court, *J. Analytical Chemical*.
- NotoSoehardjo I, 1999a, A novel prosedur of silver sataining for nucleic acid in agarose gels, *Folia Medica Indonesia*, XXXV Juli-Sept 1999, Surabaya.
- Notosoehardjo I, 1999b, Penentuan jenis kelamin berdasarkan Pemeriksaan DNA dan Antropometri tulang, Disertasi Doktor, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Notosoehardjo I, 2000, Isolasi tulang dan gigi, Lokakarya Metodologi Laboratorium Biologi Molekuler, hal 2 – 6.
- Notosoehardjo I, 2001, DNA Forensics; Paternity test, Past, Present, and Future, *J. For. Scien*, VIII, pp 34-45.
- Notosoehardjo I, Kuntaman, 2002, Teori dasar dan penerapan Praktis PCR, TDC Universitas Airlangga, hal 1-11.
- Notosoehardjo I, 2003, Perkembangan ilmu kedokteran kehakiman menuju ilmu kedokteran forensik, Pidato ilmiah pengukuhan guru besar biodang ilmu kedokteran Forensik, Universitas Airlangga, Surabaya.

- Old RW and S.B Primrose, 2003, Prinsip-prinsip Manipulasi Gen, pengantar Rekayasa Genetik,UIP.
- Prentis S, 1985, Bioteknologi, Penerbit Erlangga, Jakarta
- Putra S T et al, 1999, Biologi Molekuler Kedokteran, Edisi 2. AUP
- Robert F W, 2005, Molecular Biology, 3rd Ed, McGraw-Hill,Toronto,pp 18–82.
- Roy R, et al, 1996, Producing STR locus Pattern from Bloodstains and Other Forensic Samples Using an Infrared Fluorescent Automated DNA sequencer, *Journal of Forensic Sci.* Vol 41. No 3 May 1996, pp 418-424
- Sylvia A and Wilson L M,1992, Pathophysiology, Clinical Concepts of Disease Proces, 4nd.Ed, by Mosby Year Book,Inc.page 1260-1266.
- Tjokroprawiro A et al, 1997, Pedoman Penelitian Kedokteran, Airlangga University Press, Surabaya.
- Tjokronegoro A and Sudarsono S, 1999, Metodologi Penelitian Bidang Kedokteran, Balai Penerbit FKUI, Jakarta
- Watson et.al, 1986, Molecular Biology of The Gene, 4nd.Ed. Cummings Publishing Company,Inc.
- Westwood SA & Werret DJ,1990, An evaluation of the Polymerase Chain Reaction method for forensic application, *Elsevier Science International*, pp 201-215.
- Waiyawuth W, et al, 1998, Genetic analysis of the STR system D12S391 in the German and three Asian population, *Journal of Sci. Inter.*94(1998) 25-31.
- Watson D J et al, 1988, DNA Rekombinan,Penerbit Erlangga, 1988.
- William G E,1992, Introduction Forensic Science, 2 ed, CRC Press Boca Rotan Florida, pp 232-259.
- Yudha Patria S, 2005, Aplikasi Teknologi Sidik jari DNA dalam diagnostic kelainan genetic, makalah seminar nasional, Bioteknologi UGM, 29 Agustus 2005.
- Zahir S A, 1990, DNA sebagai materi genetic pengkode Protein: Struktur, Fungsi dan sifat Biologis, Kumpulan makalah symposium HKKI.
- Zainuddin M, 2000, Metodologi Penelitian, Kumpulan kuliah Pascasarjana UNAIR

LAMPIRAN 1: Pernyataan Persetujuan**PERNYATAAN PERSETUJUAN**

Yang bertanda tangan dibawah ini ,

Nama :

Tempat/tanggal lahir :

Umur :

Jenis kelamin : **L/P**

Saya bersedia menjadi subyek pengambilan sampel dari penelitian berjudul: **'ISOLASI DNA DARI BERCAK KERINGAT PADA PAKAIAN SEBAGAI BAHAN IDENTIFIKASI FORENSIK'**. Adapun manfaat penelitian ini memberi informasi baru dalam dunia kedokteran forensik dan memberi bantuan dalam penyidikan penegakkan hukum di Indonesia.

Saya telah membaca/dibacakan penjelasan tersebut diatas dan saya diberi kesempatan untuk menyatakan hal-hal yang belum jelas dan telah diberi jawaban yang memuaskan.

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

Surabaya, Desember 2005

Peneliti

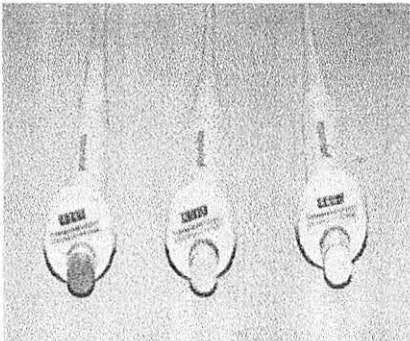
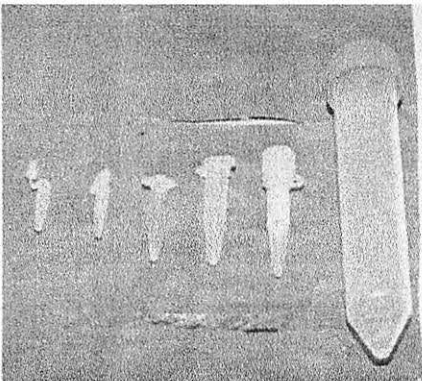
Subyek Peneliti

(Ahmad Yudianto,dr)

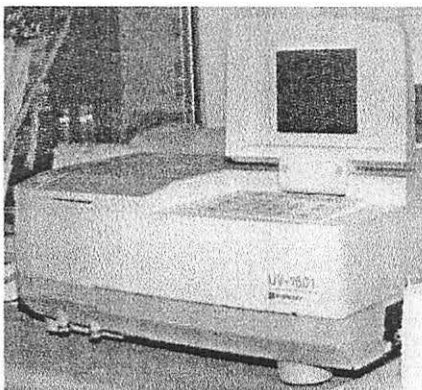
()

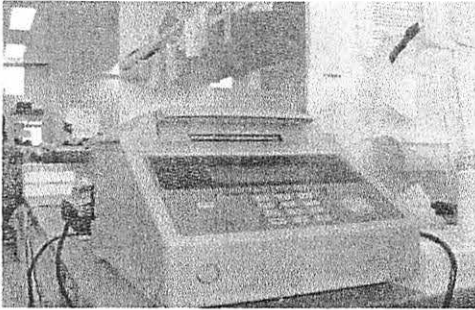
LAMPIRAN 2 : Bahan dan Alat Penelitian**Bahan- bahan isolasi antara lain :**

- DNazol Reagent
- Lar. Ethanol absolute
- Lar. Ethanol 70%
- Lar. NaOH 8 mM

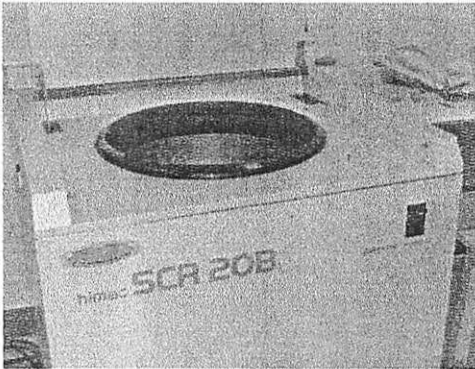
**Micropipet berbagai ukuran****Tabung dari kiri :**

- Tab. Eppendorf 0,200 ml
- Tab. Eppendorf 0,500 ml
- Tab. Eppendorf 1 ml
- Tab. Eppendorf 1,5 ml
- Tab. Eppendorf 2 ml
- Tab. Pusing disposable.

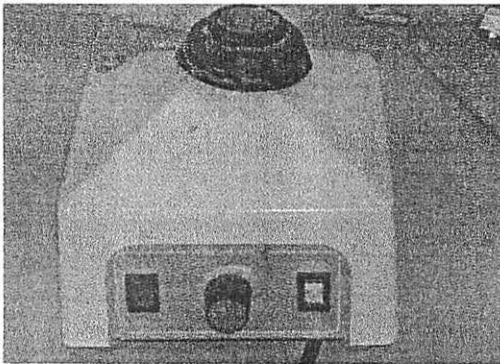
**UV-Visible Spectrophotometer
(Shimatzu)**



PCR Cycle (Gene Amp,Applied Biosystem)

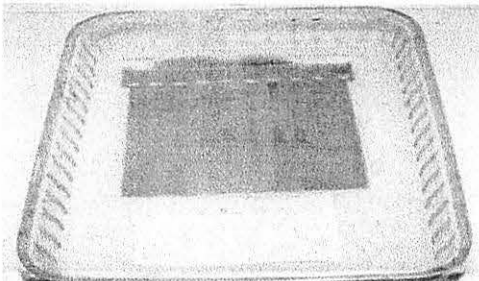
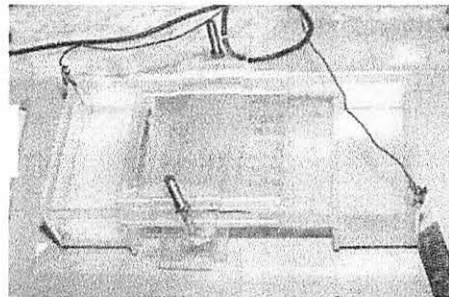


Centrifuge (Himac)



Vortex

Proses Electrophoresis



Proses Staining