



Desain Mini Primer STR Lokus *TH01* dan *D21S11* untuk Amplifikasi DNA Darah Terpapar Suhu Tinggi

Ivory Martha Pertiwi¹, Kireida Asta Nugraheni¹, Niken Satuti Nur Handayani^{1*}

¹Departemen Biologi Tropika, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada 55281 Yogyakarta, Indonesia

*Corresponding author e-mail: niken_satuti@ugm.ac.id

Article History:

Received: 20-06-2023

Accepted: 26-10-2023

Published: 31-12-2023



Copyright: This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Abstrak

Identifikasi DNA berperan penting dalam dunia forensik untuk menyelidiki suatu kasus. Namun, permasalahan yang sering dijumpai adalah DNA yang ditemukan sulit dianalisis karena jumlahnya terbatas dan mengalami degradasi. Alternatif yang digunakan dalam pemeriksaan DNA adalah membuat rancangan *mini primer* untuk amplifikasi. *Mini primer* dapat menghasilkan profil DNA bahkan pada sampel yang memiliki kuantitas dan kualitas sangat rendah. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas *mini primer* dalam amplifikasi lokus *TH01* dan *D21S11* pada DNA yang terpapar suhu tinggi. Selain itu, mengetahui pengaruh paparan suhu tinggi terhadap kualitas dan kuantitas DNA. Sampel yang digunakan yaitu 3 ml darah manusia yang diberi perlakuan suhu 100, 150, dan 200°C selama 10, 20, dan 30 menit. Metode yang digunakan adalah amplifikasi PCR menggunakan *mini primer* lokus *TH01* dan *D21S11*. Data kuantitas dianalisis dengan metode *Two Way Anova*, sedangkan kualitas DNA diuji dengan elektroforesis gel agarose. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan suhu mempengaruhi kuantitas dan kualitas DNA. Lokus *TH01* pada sampel DNA yang diberi perlakuan suhu tinggi dapat diamplifikasi menggunakan pasangan primer MP1F*TH01* dan MP1R*TH01*. Pada lokus *D21S11*, penggunaan pasangan primer MP1FD*21S11* dan MP1RD*21S11* dapat dikombinasikan untuk mengidentifikasi sampel DNA dengan perlakuan suhu tinggi.

Kata kunci: *mini primer*; *TH01*; *D21S11*; DNA; suhu tinggi

Abstract

DNA identification has an important role in forensics to investigate a case. However, the problem that is often encountered is that the DNA found is difficult to analyze because the amount is relatively small and degraded. An alternative used in DNA examination is to design *mini primers* for amplification. *Mini primers* can produce DNA profiles even in samples that have very low quantity and quality. Therefore, this study aims to determine the effectiveness of *mini primers* for amplification of *TH01* and *D21S11* loci in DNA exposed to high temperatures. In addition, to determine the effect of high temperature exposure on DNA quality and quantity. The samples used were 3 ml of human blood treated with 100, 150, and 200°C for 10, 20, and 30 minutes. The method used was PCR amplification using *mini primers* *TH01* and *D21S11* loci. Quantity data were analyzed by a parametric test using the *Two Way Anova* method. Meanwhile, DNA quality was tested by agarose gel electrophoresis. The results showed that temperature treatment affected the quantity and quality of DNA. The *TH01* locus in DNA samples treated with high temperature can be amplified using primer pairs MP1F*TH01* and MP1R*TH01*. At the *D21S11* locus, the use of primers 1 and 2 can be combined to identify DNA samples with high temperature treatment.

Keywords: *mini primer*; *TH01*; *D21S11*; DNA; high temperature

1. PENDAHULUAN

Perkembangan bidang forensik untuk mengungkap identitas individu dalam beberapa kasus yang terjadi di Indonesia dapat dilakukan dengan identifikasi DNA (*Deoxyribonucleic Acid*). Pada dasarnya, DNA yang terkandung di dalam sampel seperti darah dapat mengalami degradasi di TKP (Tempat Kejadian Perkara) akibat adanya kontaminan seperti bakteri dan jamur serta terpapar berbagai bahan kimia, sinar UV, kelembaban, dan suhu tinggi. Alternatif yang digunakan untuk mengidentifikasi sampel ini adalah mendesain *mini primer* STR yang dapat mengamplifikasi DNA yang telah terdegradasi [1][2]. *Short Tandem Repeat* (STR) adalah penanda sekuens DNA yang memiliki pengulangan pendek secara berulang dengan ukuran 1-6 basa [3].

Pada penelitian ini digunakan lokus *TH01* dan *D21S11*. Kedua lokus ini termasuk ke dalam lokus standar nasional yang memiliki pengulangan nukleotida kompleks dan biasa digunakan sebagai penanda DNA pada identifikasi kasus forensik. Motif pengulangan tetranukleotida pada lokus *D21S11* adalah (T-C-T-A) (T-C-T-G) dengan lokasi spesifik pada kromosom nomor 21. Sementara lokus *TH01* berlokasi di kromosom 11 dengan motif pengulangan (T-C-A-T) [1]. Indikator DNA yang telah mengalami degradasi dan perubahan kualitas dapat dilihat dengan pita (*band*) DNA yang melemah hingga tidak muncul saat visualisasi gel elektroforesis. Selain itu, DNA akan mengalami perubahan kuantitas. Hal ini ditandai dengan penurunan kadar DNA [4][5]. Pada kondisi ini dibutuhkan *mini primer* agar DNA dapat diamplifikasi dengan baik.

Primer adalah fragmen pendek DNA dengan sekuens tertentu yang dapat melengkapi DNA target pada proses PCR [6]. Parameter primer yang baik didasarkan

pada panjang basa, %GC, *Melting Temperature* (T_m), primer *dimer*, stabilitas, struktur sekunder, *repeats* dan *runs*, serta *hairpin*. Panjang primer yang ideal berkisar antara 18-30 bp. %GC yang baik pada suatu primer adalah 40-60%. T_m yang baik adalah 50-65°C. Adapun bentuk *dimer* pada primer dibedakan atas *self-dimer* dan *cross dimer*. Nilai *self-dimer* yang dapat ditoleransi pada ujung 3' adalah ΔG yaitu -5 kkal/mol dan ΔG bagian internal yaitu -6 kkal/mol. Adapun nilai *cross dimer* ΔG pada ujung 3' adalah -5 kkal/mol dan ΔG bagian internal yaitu -6 kkal/mol. *Repeats* yang terdapat pada primer tidak boleh lebih dari 4 *repeats*. Nilai *runs* yang dapat ditoleransi pada suatu primer adalah tidak lebih dari 5 basa [7].

Penelitian mengenai amplifikasi lokus *TH01* telah dilakukan sebelumnya menggunakan primer standar dengan sampel darah dan semen yang diberi perlakuan suhu hingga 100°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa DNA tidak dapat terdeteksi karena terjadinya degradasi, sehingga diperlukan alternatif lain berupa *mini primer*. Sementara itu, penelitian mengenai efektivitas *mini primer* beberapa lokus dari Promega telah dilakukan oleh Yudianto & Setiawan. Pada penelitian tersebut, Yudianto & Setiawan menguji efektivitas *mini primer* dari Promega untuk lokus CSF1PO, FGA, dan *D21S11* menggunakan sampel gigi molar dengan DNA terdegradasi akibat paparan suhu 500°C dan 750°C selama 20 dan 30 menit. Namun, hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pada lokus *D21S11* tidak dapat dideteksi pada suhu 500°C maupun 750°C menggunakan *mini primer* yang telah ada. Hasil penelitian tersebut perlu dikaji ulang, karena hanya menggunakan sampel berupa gigi. Dalam hal ini, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mendesain *mini primer* yang cocok

untuk identifikasi DNA yang terdegradasi [8][9].

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas *mini primer* lokus *TH01* dan *D21S11* untuk mengamplifikasi DNA dengan paparan suhu tinggi. Selain itu, mengetahui pengaruh paparan suhu tinggi terhadap kualitas dan kuantitas DNA.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel darah dari probandus sebanyak 3 ml, tabung vacutainer tanpa EDTA, buffer TE pH 8,0, *Chelex* 5%, dtt 0,05M, proteinase K, Komponen PCR meliputi *PowerPol 2X PCR Mix with Dye* (Abclonal), *DNA template*, *Nuclease-free water*, *forward primer*, dan *reverse primer* lokus *TH01* dan *D21S11* 10 μ M, sekuens lokus *TH01* (*Acc. Number* NG008128) dan lokus *D21S11* (*Acc. Number* M84567.1), buffer TAE 1X, *agarose*, *fluorosafe*, *hyperladder* 100bp, alkohol, akuades, pipet tip, *microtube*.

2.2. Alat

Peralatan yang digunakan meliputi *sprit*, *tourniquet*, oven (*Memmert UN 55*), cawan petri, mikropipet (*Eppendorf*), *website Primer3Plus*, *centrifuge*, *heat block*, *vortex*, *spin down* (*Wealtee*), *SimpliAmp thermal cycler*, *Nanodrop Spectrophotometer*, *microwave* (*Sharp*), perangkat elektroforesis (*MUPID - eXU*), dan alat *Gel documentation system* (*Gel Doc Uv Transilluminator*) beserta komputer.

2.3. Cara Kerja

Penelitian dilakukan setelah mendapatkan surat kelaikan etik dengan nomor KE-FK-1603-EC-2022 dan KE-FK-1604-EC-2022 dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan

Keperawatan Universitas Gadjah Mada. *Primer* didesain menggunakan program *Primer3Plus* dengan sekuens lokus *TH01* dan *D21S11* yang diperoleh dari NCBI. Kandidat primer yang muncul dilakukan pengecekan *secondary structure* dengan program *NetPrimer* untuk melihat efisiensi dari pasangan primer. *Secondary structure* merupakan interaksi intramolekul atau antarmolekul meliputi *hairpin*, *dimer*, *run*, dan *repeats* yang dapat menghambat proses PCR karena menurunkan efisiensi primer [10]. Sampel yang digunakan adalah darah dari satu probandus sebanyak 3 ml. Darah diberi perlakuan suhu yaitu, 100, 150, dan 200°C selama 10, 20, dan 30 menit masing-masing sebanyak 100 μ l. Sampel diekstraksi menggunakan metode *chelex*. *Chelex* merupakan resin *chelating* yang umum digunakan dalam bidang forensik untuk ekstraksi DNA dari berbagai sumber seperti rambut, noda darah, dan *buccal swab*. Keunggulan teknik ini yaitu cepat, tidak mengandung bahan kimia berbahaya, dan dapat menghasilkan DNA berkualitas tinggi untuk penyelidikan molekuler [11].

Kualitas DNA diuji menggunakan elektroforesis *agarose gel* 0,8% dan uji kuantitas dilakukan dengan *Nanodrop Spectrophotometer*. Proses PCR dilakukan dengan *SimpliAmp Thermo cycler* dengan program suhu yaitu 98°C selama 45 detik untuk pre-denaturasi, 98°C selama 10 detik untuk denaturasi, proses *annealing* suhu 50-60°C selama 30 detik, 72°C selama 30 detik untuk *extension*, dan 72°C selama 5 menit untuk *post-extension*. Hasil amplifikasi DNA sampel darah divisualisasi menggunakan gel elektroforesis dengan *agarose gel* 1%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Spesifikasi Primer

Primer *MP1FD21S11* memiliki panjang sekuens 20 bp, *Tm* 55,0°C dan GC

content sebesar 50%. Sementara itu, primer MP1RD21S11 memiliki panjang sekuens 20 bp, T_m 55,5°C dan GC *content* 40%. Apabila dilihat berdasarkan T_m , hasilnya memenuhi syarat T_m optimum. Selisih T_m antara primer *forward* dan *reverse* pada pasangan primer MP1FD21S11 dan MP1RD21S11 adalah 0,5°C sehingga memenuhi kriteria selisih primer *forward* dan *reverse*. Adapun %GC *content* pada primer *forward* maupun *reverse* sudah memenuhi syarat %GC *content* yang optimum yaitu berada dalam kisaran 40-60%.

Self-dimer pada primer MP1RD21S11 yang terbentuk berada pada bagian internal. *Self-dimer* yang terbentuk pada primer MP1RD21S11 mudah untuk dipecah karena memiliki ΔG bernilai lebih besar daripada -6 kkal/mol. Struktur sekunder *runs* ditemukan pada primer *forward* (MP1FD21S11) dan primer *reverse* (MP1RD21S11) dan masih dapat ditoleransi karena tidak lebih dari 4. Sementara itu, *cross dimer* pada pasangan primer MP1FD21S11 dan MP1RD21S11 sulit dipecah karena lebih kecil daripada -6 kkal/mol. Meskipun demikian, pasangan primer MP1FD21S11 dan MP1RD21S11 tetap dipilih karena tidak memiliki struktur *hairpin* dan *repeats* untuk kedua primer, memiliki *self-dimer* yang dapat dipecah, dan memiliki *runs* yang dapat ditoleransi.

Primer MP3RD21S11 dengan memiliki panjang sekuens 21 bp, T_m 54,8°C dan GC *content* 47,6%. Apabila dilihat berdasarkan T_m , hasilnya memenuhi syarat T_m optimum. Selisih T_m antara primer MP3FD21S11 dan MP3RD21S11 bernilai 0,3°C sehingga memenuhi kriteria selisih primer *forward* dan *reverse*. Adapun %GC *content* pada primer MP3FD21S11 dan MP3RD21S11 %GC *Content* yang optimum yaitu berada dalam kisaran 40-60%.

Adapun pada primer MP3FD21S11 terdapat struktur *hairpin* yang masih dapat dipecah karena bernilai lebih besar daripada -2 kkal/mol. Adapun nilai *hairpin* primer MP3RD21S11 bernilai lebih kecil daripada -2 kkal/mol sehingga sulit dipecah. Struktur sekunder lain adalah *self-dimer* pada primer MP3FD21S11 dan MP3RD21S11 yang dapat dipecah dengan mudah karena bernilai lebih besar daripada -6 kkal/mol. Selain struktur *hairpin* dan *self-dimer*, pasangan MP3FD21S11 dan MP3RD21S11 memiliki *cross dimer* yang dapat dipecah dengan mudah karena bernilai lebih besar daripada -6 kkal/mol. Meskipun demikian, pasangan primer MP3FD21S11 dan MP3RD21S11 tetap dipilih karena memiliki ukuran ampikon lebih kecil dibandingkan kandidat primer yang lain serta memiliki kriteria yang baik.

Pasangan primer pertama lokus *TH01* (MP1FTH01 dan MP1RTH01) memiliki panjang sekuens 20 bp. T_m primer *forward* dan primer *reverse* sudah sesuai berdasarkan ketentuan primer yang baik. Selisih suhu antara kedua primer tidak lebih dari 5°C. Kemudian kandungan GC pada primer *forward* dan *reverse* masuk ke dalam rentang GC yang dianjurkan yaitu antara 40-60% [12]. Panjang ampikon atau produk PCR yang diperoleh sebesar 236bp. Primer ini termasuk *mini primer* karena memiliki ampikon antara 50-280bp, sehingga diharapkan dapat mengidentifikasi DNA yang terdegradasi [13].

Pada primer ini tidak ditemukan *hairpin*. Sementara itu, kedua primer ditemukan struktur *self-dimer*, *cross dimer*, dan *run*. *Cross dimer* pada primer tersebut masih dapat dipecah karena tidak melebihi nilai maksimum *cross dimer* [14]. Pasangan primer pertama dipilih sebagai kandidat karena memiliki spesifikasi yang sesuai ketentuan primer, tidak memiliki struktur *hairpin*, *repeats*, dan *run*.

Primer MP2FTH01 dan MP2RTH01 memiliki panjang sekuens 15 bp pada primer *forward* dan 14 bp pada primer *reverse*. Tm primer *forward* adalah 51,7°C, sedangkan primer *reverse* 50,5°C. Selisih suhu antara kedua primer sangat kecil yaitu 1,2°C. Kandungan GC pada primer *forward* dan primer *reverse* sebesar masuk ke dalam rentang GC yang dianjurkan yaitu antara 40-60% [12]. Ukuran amplikon atau produk PCR yang diperoleh sebesar 153 bp. Oleh karena itu, primer ini diharapkan dapat mengidentifikasi DNA yang terdegradasi karena merupakan *mini primer* dimana memiliki panjang amplikon antara 50-280bp [13].

Hasil pemeriksaan *secondary structure* diperoleh struktur *hairpin* pada kedua primer namun masih dapat ditoleransi karena nilai *hairpin* tersebut kurang dari -2 kkal/mol dan -3 kkal/mol. Pada pasangan primer ini juga ditemukan struktur *self-dimer* pada primer *forward* dan primer *reverse* yang sulit dipecah karena melebihi nilai maksimum *self-dimer* [14]. Struktur *run* ditemukan pada primer *forward* dan primer *reverse*. Namun, primer ini tidak memiliki struktur *repeats* dan *cross dimer*. Alasan pasangan primer tersebut dipilih sebagai salah satu kandidat karena memiliki spesifikasi yang telah sesuai.

Pasangan primer MP3FTH01 dan MP3RTH01 memiliki panjang sekuens 15 bp pada primer *forward* 14 bp pada primer *reverse*. Tm primer *forward* dan primer *reverse* 49,3°C sesuai dengan suhu Tm yang dianjurkan yaitu berada dalam rentang 45-65 °C. Selisih suhu antara kedua primer tidak lebih dari 5 °C. Kandungan GC pada primer *forward* sebesar 60% dan primer *reverse* sebesar 57,1%. Panjang amplikon yang diperoleh sebesar 215bp.

Pasangan primer ini tidak memiliki struktur *hairpin*. Akan tetapi, pada primer *forward* ditemukan struktur *self-dimer*

sebesar -8,05 kkal/mol, sedangkan primer *reverse* sebesar -9,89 kkal/mol. Struktur *cross dimer* yang ditemukan sebesar -12,89 kkal/mol. Primer ini dimungkinkan akan sulit memecah struktur *dimer* karena melebihi nilai maksimum *self-dimer* yaitu pada ujung 3' sebesar -5 kkal/mol dan bagian internal sebesar -6 kkal/mol [14]. Pengulangan urutan basa ditemukan pada keduanya sebesar 3 kali. Kemudian, primer ini tidak memiliki struktur *repeats*. Pasangan primer tersebut dipilih sebagai salah satu kandidat karena memiliki spesifikasi yang telah sesuai dan efisiensi penempelan primer cukup tinggi yaitu mencapai 85%.

3.2. Kualitas dan Kuantitas DNA

Tabel 1. Hasil uji kuantitas dan kemurnian DNA pada suhu dan waktu paparan berbeda

Suhu paparan (°C)	Durasi waktu (menit)	Konsentrasi (ng/μL)	Kemurnian DNA (A260/A280)
100	10	554,25±70,45	1,22±0,53
100	20	527,43±68,88	1,06±0,52
100	30	524,95±93,92	1,13±0,83
150	10	468,05±33,46	1,03±0,76
150	20	436,82±30,27	1,09±0,62
150	30	593,33±21,75	1,07±0,48
200	10	596,67±6,69	1,22±0,16
200	20	371,04±39,56	1,56±0,17
200	30	336,37±27,55	1,58±0,65
Kontrol (suhu ruang)	-	690,35±45,55	1,10±0,61

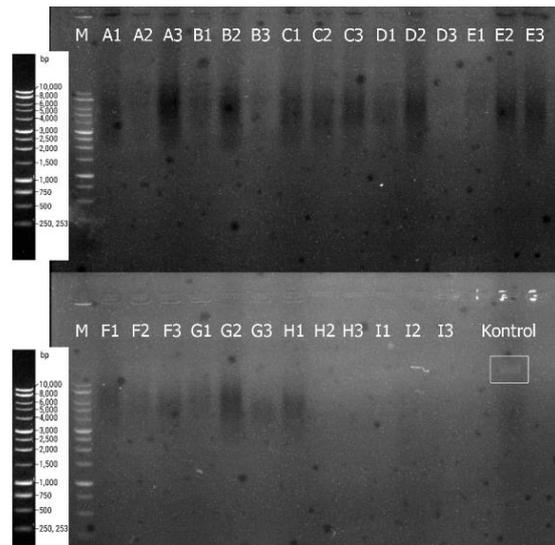
Berdasarkan hasil pengukuran kuantitas DNA (Tabeanalisisl 1) dapat dilihat bahwa sampel kontrol (suhu ruang 27°C) memiliki kadar DNA terbesar yaitu 690,34 ng/μL. Sampel dengan perlakuan 100°C 10 menit, 20 menit, 30 menit secara berurutan memiliki rata rata 554,24 ng/μL, 527,4 ng/μL, dan 524,9 ng/μL. Sementara, Sampel dengan perlakuan 150°C selama 10 menit, 20 menit, 30 menit secara berurutan memiliki rata rata 468,04 ng/μL, 436,81

ng/ μ L, dan 593,32 ng/ μ L. Pada sampel dengan perlakuan 200°C selama 10 menit, 20 menit, 30 menit secara berurutan memiliki rata-rata 596,72 ng/ μ L, 371,03 ng/ μ L, dan 336,36 ng/ μ L.

Pada uji statistik parametrik yang dilakukan, suhu dan waktu dapat berpengaruh secara signifikan terhadap nilai konsentrasi DNA karena nilai $p < 0,05$. Suhu tinggi dapat menyebabkan penurunan konsentrasi DNA [15]. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Saputro *et al.* pada tahun 2015, semakin lama waktu paparan akan menunjukkan penurunan kadar DNA [15].

Hasil kadar DNA perlakuan 150°C selama 30 menit menunjukkan kenaikan dibandingkan dengan perlakuan sebelumnya. Hal ini karena pada kondisi di alam terdapat mikroorganisme yang menyebabkan kerusakan sel pada sampel. Alasan lain terjadi kenaikan konsentrasi pada DNA adalah sel yang stres akibat terpapar suhu tinggi dapat melakukan mekanisme pertahanan atau homeostasis sebagai respon untuk mencegah kerusakan pada DNA. Sel akan melakukan aktivasi protein dan terjadi mekanisme perbaikan enzim-enzim nuklease, helikase, polymerase, dan ligase sehingga konsentrasi DNA dapat mengalami kenaikan kembali [16].

Uji statistik ANOVA yang dilakukan, didapatkan bahwa tidak terdapat pengaruh antara suhu dan waktu yang signifikan terhadap kemurnian DNA karena nilai signifikansi $p > 0,05$. Kemurnian DNA umumnya didasarkan pada proses ekstraksi dengan nilai rentang ideal 1,8-2 [15]. Hasil elektroforesis genom dengan agarose 0,8% dapat dilihat pada Gambar 1.

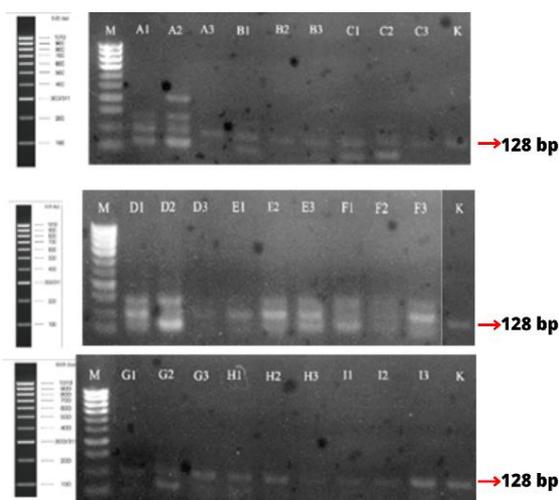


Gambar 1. Elektroforegram DNA genom. M=Ladder 1kbp. A1, A2, A3) 100°C 10 menit, B1, B2, B3) 100°C 20 menit, C1, C2, C3) 100°C 30 menit, (D1, D2, D3) 150°C 10 menit, E1, E2, E3) 150°C 20 menit, F1, F2, F3) 150°C 30 menit, G1, G2, G3) 200°C 10 menit, H1, H2, H3) 200°C 20 menit, I1, I2, I3) 200°C 30 menit, (K) Kontrol

Gambar 1 menunjukkan pita hitam yang *smear* pada sampel dengan perlakuan suhu 100°C dan 150°C. Hasil ekstraksi DNA yang memiliki kualitas baik ditunjukkan dengan pita DNA tampak jelas. Apabila pita terlihat *smear*, maka menunjukkan bahwa DNA yang diekstraksi tidak utuh atau dimungkinkan terjadinya degradasi pada sampel. Hal ini disebabkan oleh kerusakan ikatan hidrogen pada basa purin-pirimidin [17]. Sementara, pada sampel dengan perlakuan suhu 200°C memiliki kualitas yang kurang baik karena tidak tampak adanya pita DNA yang jelas dan tegas. Kemudian, pada sampel kontrol terlihat pita DNA yang tipis berada di atas ladder. Hal ini karena DNA genom memiliki fragmen yang panjang yaitu lebih dari 1 kbp, sehingga DNA tersebut tidak dapat bergerak turun dalam gel agarose [17].

3.3. Amplifikasi

Setelah dilakukan elektroforesis DNA genom, kemudian dilakukan pengujian MP1FD2IS11 dan MP1RD2IS11 serta Primer MP3FD2IS11 dan MP3RD2IS11. Seperti yang telah dipaparkan sebelumnya bahwa primer merupakan salah satu komponen penting dalam PCR. Terdapat beberapa tahapan pada teknik PCR, di antaranya adalah denaturasi, *annealing*, dan ekstensi. Primer berperan penting dalam tahap *annealing* karena dengan desain primer yang spesifik, primer akan menempel pada *site* segmen DNA target [18]. Oleh karena itu, untuk menguji apakah primer yang didesain dapat mengamplifikasi lokus *D2IS11* atau tidak, dilakukan amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR. Sebelum dilakukan amplifikasi, dilakukan optimasi suhu *annealing* terlebih dahulu untuk menentukan suhu dimana primer dapat menempel pada *site* DNA target secara spesifik. Suhu *annealing* untuk pasangan primer MP1FD2IS11 dan MP1RD2IS11 adalah 57,2°C. sedangkan, suhu *annealing* untuk pasangan primer MP3FD2IS11 dan MP3RD2IS11 adalah 56,8°C.



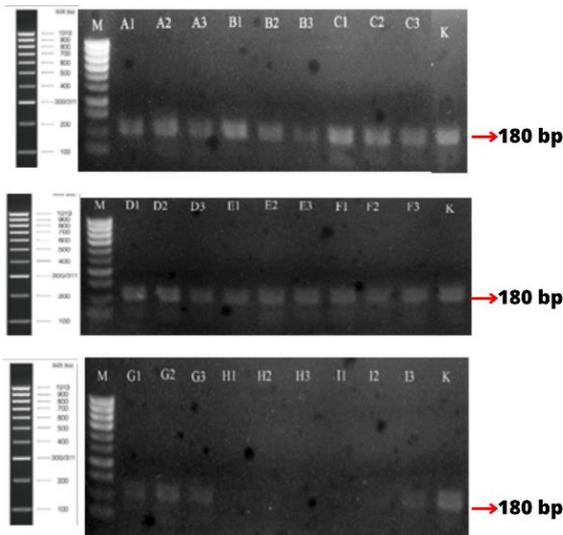
Gambar 2. Elektroforegram hasil amplifikasi pasangan primer MP1FD2IS11 dan MP1RD2IS11. M=Ladder. A1, A2, A3) 100°C 10 menit, B1, B2, B3) 100°C 20

menit, C1, C2, C3) 100°C 30 menit, (D1, D2, D3) 150°C 10 menit, E1, E2, E3) 150°C 20 menit, F1, F2, F3) 150°C 30 menit, G1, G2, G3) 200°C 10 menit, H1, H2, H3) 200°C 20 menit, I1, I2, I3) 200°C 30 menit, (K) Kontrol.

Hasil elektroforesis (Gambar 2) pada sampel yang diberi perlakuan 100°C selama 10 menit, 20 menit, dan 30 menit menunjukkan DNA yang terfragmentasi atau terpotong-potong. Apabila dibandingkan dengan sampel kontrol, pita DNA dapat terlihat dengan jelas pada ukuran 128 bp. Sehingga, dapat dikatakan bahwa pasangan primer MP1FD2IS11 dan MP1RD2IS11 yang didesain tidak dapat mengamplifikasi DNA pada lokus *D2IS11* akibat terpapar suhu 100°C. Hasil elektroforesis pada sampel yang diberi perlakuan suhu 150°C selama 10 menit, 20 menit, dan 30 menit menunjukkan bahwa DNA telah terfragmentasi. Hal ini dapat ditunjukkan dengan pita DNA yang terpotong-potong pada ukuran tertentu. Sehingga, dapat dikatakan bahwa pasangan primer MP1FD2IS11 dan MP1RD2IS11 tidak dapat mengamplifikasi lokus *D2IS11* pada sampel DNA yang diberi paparan suhu 150°C selama 10 menit, 20 menit, dan 30 menit.

Hasil elektroforesis pada sampel yang diberi perlakuan suhu 200°C selama 10 menit menunjukkan bahwa terdapat potongan-potongan pita DNA. Sementara itu, hasil elektroforesis pada sampel yang diberi perlakuan suhu 200°C selama 20 menit menunjukkan bahwa DNA dapat teramplifikasi pada ukuran ampikon yang sesuai. Hal ini dapat dilihat pada sampel H2 dan H3 meskipun pita DNA yang terlihat tipis. Adapun hasil elektroforesis pada sampel yang diberi perlakuan suhu 200°C selama 30 menit juga menunjukkan bahwa DNA dapat teramplifikasi pada ukuran ampikon yang sesuai. Hal ini dapat

ditunjukkan dengan pita DNA *single band* dan bersih yang teramati pada sampel I1 dan I2 meskipun tipis. Namun, pita DNA *single band* pada sampel I3 dapat terlihat dengan jelas, bersih, tebal, dan tanpa disertai *smear*. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa pasangan primer MP1FD2IS11 dan MP1RD2IS11 dapat mengamplifikasi lokus D2IS11 pada sampel DNA yang diberi paparan suhu 200°C selama 20 menit dan 30 menit.



Gambar 3. Elektroforegram hasil amplifikasi pasangan primer MP3FD2IS11 dan MP3RD2IS11. M=Ladder. A1, A2, A3) 100°C 10 menit, B1, B2, B3) 100°C 20 menit, C1, C2, C3) 100°C 30 menit, (D1, D2, D3) 150°C 10 menit, E1, E2, E3) 150°C 20 menit, F1, F2, F3) 150°C 30 menit, G1, G2, G3) 200°C 10 menit, H1, H2, H3) 200°C 20 menit, I1, I2, I3) 200°C 30 menit, (K) Kontrol.

Sampel DNA yang diberi paparan suhu 100°C selama 10 menit dapat teramplifikasi oleh pasangan primer MP3FD2IS11 dan MP3RD2IS11 (Gambar 3). Hal ini ditunjukkan dengan adanya pita DNA yang jelas terlihat pada sampel A1, A2, dan A3 dengan ukuran 180 bp. Adapun pada sampel DNA yang diberi paparan suhu 100°C selama 20 menit menunjukkan adanya pita DNA yang jelas terlihat pada sampel B1, B2, dan B3 dengan ukuran 180

bp. Sementara itu, pada sampel C1, C2, C3 yang diberi paparan suhu 100°C selama 30 menit juga menunjukkan pita DNA yang terlihat dengan jelas dengan suhu 180 bp. Sehingga, dapat dikatakan bahwa pasangan primer MP3FD2IS11 dan MP3RD2IS11 dapat mengamplifikasi lokus D2IS11 pada sampel DNA yang diberikan paparan suhu 100°C selama 10 menit, 20 menit, dan 30 menit.

DNA dapat teramplifikasi pada ukuran 180 bp. Hal ini dapat ditunjukkan dengan munculnya pita DNA yang jelas pada sampel D1, D2, dan D3. Adapun pada sampel yang diberi perlakuan suhu 150°C selama 20 menit menunjukkan bahwa DNA dapat teramplifikasi dengan ukuran 180 bp. Hal ini dapat ditunjukkan dengan munculnya pita DNA yang jelas pada sampel E1, E2, dan E3. Sementara itu, pada sampel yang diberi perlakuan suhu 150°C selama 30 menit menunjukkan bahwa DNA dapat teramplifikasi dengan ukuran 180 bp. Hal ini dapat ditunjukkan dengan munculnya pita DNA yang jelas pada sampel F1, F2, dan F3. Sehingga, dapat dikatakan bahwa primer 2 juga dapat mengamplifikasi lokus D2IS11 pada DNA terdegradasi akibat terpapar suhu 150°C selama 10 menit, 20 menit, dan 30 menit.

Pada sampel yang diberi perlakuan suhu 200°C selama 10 menit dapat diamplifikasi menggunakan pasangan primer MP3FD2IS11 dan MP3RD2IS11. Hal ini dapat ditunjukkan dengan adanya pita DNA yang jelas pada sampel G1, G2, dan G3. Adapun sampel yang diberi perlakuan 200°C selama 20 menit dan 30 menit tidak dapat diamplifikasi menggunakan primer 2. Hal ini ditunjukkan dengan tidak munculnya pita DNA pada sampel H1, H2, H3, I1, I2, dan I3. Sehingga, dapat dikatakan bahwa primer 2 tidak dapat mengamplifikasi DNA yang diberi paparan suhu 200°C dengan selama 20 menit dan 30

menit. Menurut Butler (2003), DNA yang telah mengalami proses degradasi dan penurunan konsentrasi sebanyak 1 ng/ μ L berpotensi menurunkan kemampuan untuk deteksi lokus STR hingga 95%. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa perbedaan kuantitas setiap sampel dapat ditunjukkan oleh tebal tipisnya DNA yang berpendar pada visualisasi hasil elektroforesis [19]. Dalam hal ini, sampel H dan I memiliki rata-rata konsentrasi DNA yang rendah dibandingkan dengan perlakuan yang lain.

Sehingga, dengan paparan suhu tinggi dan durasi waktu yang lama, sampel H dan I tidak menunjukkan adanya pita DNA apabila diamplifikasi dengan pasangan primer MP3FD21S11 dan MP3RD21S11. Hal ini juga dapat dilihat dengan tidak munculnya pita DNA pada elektroforesis DNA genom sampel H dan I (Gambar 1). Bahkan, berdasarkan Gambar 1, tidak terdapat *smear* pada sampel H dan I.

Proses degradasi pada DNA dapat menyebabkan penurunan kualitas DNA yang disebabkan oleh faktor endogen dan faktor eksogen. Faktor endogen adalah faktor yang berasal dari sel, yaitu kerusakan spontan. Sedangkan, faktor eksogen adalah faktor yang berasal dari luar yaitu lingkungan. Dalam hal ini, faktor lingkungan yang dapat menyebabkan degradasi pada DNA adalah kontaminasi dari bakteri, paparan oleh bahan kimia, suhu tinggi, dan kelembaban. Selain itu, degradasi atau kerusakan DNA juga dapat dipengaruhi oleh durasi paparan suhu tinggi. Kualitas DNA dapat menurun oleh adanya proses pemanasan suhu tinggi [9]

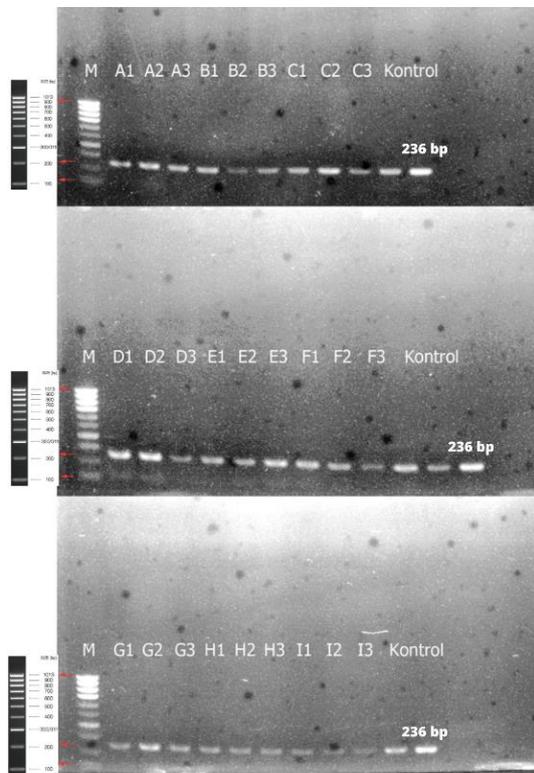
Pada penelitian ini, diberikan paparan suhu 100°C sebagai representasi suhu dimana DNA dapat stabil dan tidak mengalami degradasi. Proses degradasi pada DNA pada dasarnya dimulai dari suhu

130°C dan terdegradasi secara penuh pada suhu 190°C. Sehingga, pada penelitian ini diberikan paparan suhu 150°C sebagai representasi DNA yang mulai terdegradasi dan 200°C sebagai representasi DNA yang terdegradasi secara penuh. Sementara itu, durasi waktu paparan 10 menit, 20 menit, dan 30 menit merupakan representasi lama waktu kejadian. Lokus STR dapat diamplifikasi dengan baik dengan durasi waktu paparan 2-15 menit untuk DNA yang telah terfragmentasi atau terdegradasi [5]. Indikator DNA yang telah mengalami degradasi dapat dilihat dengan pita (*band*) DNA yang melemah hingga tidak muncul pada ukuran basa tertentu saat visualisasi gel elektroforesis [4].

Pasangan primer MP1FD21S11 dan MP1RD21S11 serta pasangan primer MP3FD21S11 dan MP3RD21S11 dapat dikombinasikan untuk mengamplifikasi sampel DNA terpapar suhu 100°C, 150°C, dan 200°C. Selanjutnya, dilakukan amplifikasi DNA pada lokus *TH01* menggunakan pasangan *mini primer* MP1FTH01 dan MP1RTH01 yang hasilnya dapat dilihat pada Gambar 4.

Visualisasi produk PCR dengan suhu *annealing* 57,2°C menunjukkan adanya pita DNA pada semua sampel dari kontrol hingga perlakuan 200°C selama 30 menit. Akan tetapi, sampel tersebut tidak menunjukkan ketebalan pita DNA yang sama. Pita DNA pada sampel dengan perlakuan suhu 200°C terlihat lebih tipis daripada perlakuan suhu 100°C dan 150°C. Hal ini dapat disebabkan karena konsentrasi DNA hasil ekstraksi yang lebih rendah. Pada dasarnya, penurunan konsentrasi DNA sebesar 1 ng dapat mempengaruhi hasil deteksi [20]. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa pasangan primer MP1FTH01 dan MP1RTH01 berhasil mengamplifikasi lokus *TH01* pada sampel DNA yang diberi paparan suhu tinggi.

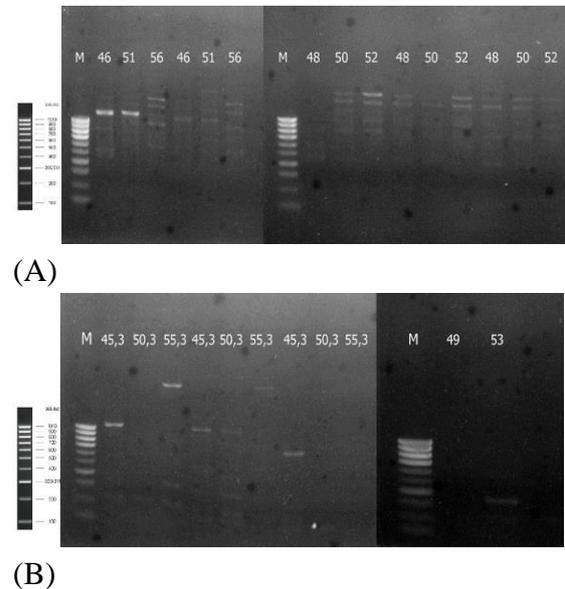
Keberhasilan proses amplifikasi dapat disebabkan kepada kesesuaian dan efisiensi primer serta optimasi PCR.



Gambar 4. Elektroforegram hasil amplifikasi pasangan primer MP1FTH01 dan MP1RTH01. M=Ladder. A1, A2, A3) 100°C 10 menit, B1, B2, B3) 100°C 20 menit, C1, C2, C3) 100°C 30 menit, (D1, D2, D3) 150°C 10 menit, E1, E2, E3) 150°C 20 menit, F1, F2, F3) 150°C 30 menit, G1, G2, G3) 200°C 10 menit, H1, H2, H3) 200°C 20 menit, I1, I2, I3) 200°C 30 menit, (K) Kontrol.

Hasil optimasi suhu pada primer MP2TH01 dan MP3TH01 (Gambar 5) menunjukkan pita DNA yang non-target dan terfragmentasi, sehingga pasangan primer tersebut tidak dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA yang diberi paparan suhu tinggi. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi tingkat kegagalan proses PCR adalah panjang fragmen DNA, konsentrasi DNA, adanya polimorfisme nukleotida tunggal atau SNPs, dan keunikan urutan primer. Kriteria primer seperti

panjang primer, kandungan GC (%), struktur sekunder, dan suhu leleh (T_m) berpengaruh terhadap hasil amplifikasi. Hal ini menyebabkan kegagalan dalam hibridisasi antara template dengan primer [20].



Gambar 5. Optimasi Kondisi PCR
A) MP2TH01 dan B) MP3TH01.

4. KESIMPULAN

Kombinasi pasangan primer MP1FD2IS11 dan primer MP1RD2IS11 serta MP3FD2IS11 dan MP3RD2IS11 dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA akibat paparan suhu 100°C, 150°C, dan 200°C. Pasangan primer MP1FD2IS11 dan MP1RD2IS11 efektif untuk mengamplifikasi DNA dengan paparan suhu 200°C selama 20 menit dan 30 menit. Adapun pasangan primer MP3FD2IS11 dan MP3RD2IS11 dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA dengan paparan suhu 100°C dan 150°C selama 10 menit, 20 menit, dan 30 menit serta 200°C selama 10 menit. Pasangan primer MP1FTH01 dan MP1RTH01 efektif dalam mengidentifikasi lokus TH01 untuk DNA yang terpapar suhu tinggi menggunakan suhu *annealing* 57,2°C. Kualitas DNA semakin menurun seiring bertambah tingginya paparan suhu.

Perlakuan suhu dan waktu mempengaruhi konsentrasi DNA, sedangkan kemurnian DNA tidak dipengaruhi oleh paparan suhu tinggi.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan peningkatan suhu perlakuan di atas 200°C untuk menentukan *critical temperature* dimana DNA tidak dapat diamplifikasi.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada serta pihak-pihak yang telah memberikan dukungan kepada peneliti sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik.

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Yulianto, A. 2020. Pemeriksaan Forensik DNA Tulang dan Gigi: Identifikasi pada DNA Lokus STR CODIS, Y-STRs, dan mtDNA. *Sintesa Propethica. Surabaya*.
- [2] Samoo, I.M., Khatri, P., Bhutto, B., Tariq, M., Chandio, I., Soomro, M., Ali, S., & Shams, S. 2017. Effect of Temperature and Storage Time on DNA Quality and Quantity from Normal and Diseased Tissues. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 13: 203-206.
- [3] Fan, H. & Chu, J. 2007. A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 5(1): 7-14.
- [4] Karni, M., Zidon, D., Polak, P., Zalevsky, Z., & Shefi, O. 2013. Thermal Degradation of DNA. *DNA and Cell Biology*, 32(6): 298-301.
- [5] Lozano-Peral, D., Rubio, L, Santos, I., Gaitán, M.J., Viguera, E., & Martín-de-las-Heras, S. 2021. DNA degradation in human teeth exposed to thermal stress. *Scientific Report*, 11(12118): 1-9.
- [6] Garibyan, L. & Avashia, N. 2013. Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*, 133(3): 1-4.
- [7] Syamsidi, A., Aanisah, N., Fiqram, R. & Jultri, I.A. 2021. Primer Design and Analysis for Detection of mecAgene. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*, 5(3): 245-253.
- [8] Yudianto, A. & Setiawan, F. 2020. The Effectiveness of *Mini primer* STR CODIS in DNA Degradation as the Effect of High-Temperature Exposure. *Analytical cellular pathology*, 2417693: 1-6.
- [9] Hady, R.H.A., Thabet, H.Z., Ebrahim, N.E., Yassa, H.A. 2021. Thermal Effects on DNA Degradation in Blood and Seminal Stains: Forensic View. *Academic Forensic Pathology*, 11(1): 7-23.
- [10] Fan, H., Wang, J., Komiyama, M., & Liang, X. 2018. Effects of Secondary Structure of DNA Templates on the Quantification of qPCR. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37(11): 1-23.
- [11] Ali, N., Rampazzo, C.P., Costa, D.T., & Krieger, M.A. 2017. Current Nucleic Acid Extraction Method and Their Implication to Point of Care Diagnostics. *BioMed Research International*, 2017: 1-13.
- [12] Lorenz, T.C. 2012. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiment*, 63: 1-5.
- [13] Opel, K.L., Chung, D.T., Drabek, J., Tatarek, N.E., Jantz, L.M., & McCord, B.C. 2006. The Application of Miniplex Primer Sets in the Analysis of Degraded DNA from Human Skeletal Remains. *Journal Forensic Science*, 51(2): 351-356.
- [14] Yustinadewi, P.D., Yustiantara, P.S., & Narayani, I. 2018. Teknik Perancangan Primer untuk Sekuen Gen MDR-1 Varian 1199 pada Sampel Buffy Coat Pasien Anak Dengan LLA. *Jurnal Metamorfosa*, 5(1): 105-111.
- [15] Saputro, A., Yudianto, A., &

- Koesbardiati, T. 2015. Pengaruh Lama Paparan Suhu Kamar terhadap Kualitas DNA pada Pemeriksaan Swab Earphone dalam Penentuan Jenis Kelamin. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, 17(1): 33-45.
- [16] Nastasi, C., Mannarino, L., & D'Incalci, M. 2020. DNA Damage Response and Immune Defense. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20): 1-28.
- [17] Yuenleni. 2019. Langkah- Langkah Optimasi PCR. *Indonesian Journal of Laboratory*, 1(3): 51-56.
- [18] Garibyan, L. & Avashia, N. 2013. Polymerase chain reaction. *The Journal of investigative dermatology*, 133(3): 1-4.
- [19] Putri, N.P.P.E. & Junitha, I.K. 2015. Kualitas dan Kuantitas DNA Darah Kering pada Besi dan Kayu yang disimpan dalam Kurun Waktu Berbeda. *Jurnal Biologi*, 19(1): 21-24.
- [20] Andreson, R., Mols, T., & Remm, M. 2008. Predicting Failure Rate of PCR in Large Genomes. *Nucleic Acids Research*, 36(11): 1-10.