

## EFEKTIVITAS MINI PRIMER SET STR CODIS [FGA, CSF1PO & D21S11] DALAM DEGRADASI DNA EFEK PAPARAN SUHU TINGGI

Ahmad Yudianto<sup>1,2,3</sup>, Ariyanto Wibowo<sup>1</sup>, Indah Nuraini<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Ilmu Kedokteran Forensik & Medikolegal FK

<sup>2</sup>Program Studi Ilmu Forensik Sekolah Pascasarjana

<sup>3</sup>Kelompok Studi Human Genetik- Lembaga Penyakit Tropik  
Universitas Airlangga Surabaya Indonesia  
2018

Korespondensi : [yudi4n6sby@yahoo.co.id](mailto:yudi4n6sby@yahoo.co.id)

### ABSTRAK

Identifikasi forensik dengan pemeriksaan DNA yang dapat digunakan untuk menentukan asal usul anak; kasus paternitas; hubungan kekeluargaan; maupun identifikasi korban tak dikenal, semakin hari semakin diakui keberadaannya dalam menunjang penegakan hukum di tanah air. Hanya saja dalam perkembangannya pemeriksaan dengan menggunakan bahan DNA ini bukannya tanpa persoalan. Salah satu persoalan yang seringkali menjadi masalah yang serius bagi ahli DNA forensik maupun ahli DNA lainnya adalah kondisi DNA yang terdegradasi atau yang dikenal dengan istilah *degraded DNA*. Salah satu alternatif yang ditempuh dalam degradasi DNA saat ini oleh ahli DNA forensik adalah melalui penggunaan *mini primer set*, yakni melalui metode pengurangan ukuran *STR assays*, pada pemeriksaan lokus DNA inti. Penelitian ini menggunakan mini primer CSF1PO, FGA & D21S11 pada bahan gigi molar dengan perlakuan paparan 500°C dalam waktu 20 dan 30 menit serta suhu 750°C dalam waktu 20 dan 30 menit.

Hasil yang didapatkan terjadi penurunan kadar DNA gigi yang bermakna ( $p < 0.05$ ) sebagai efek paparan suhu tinggi. Visualisasi hasil PCR didapatkan hanya lokus CSF1PO yang masih terdeteksi dengan *mini primer* pada paparan suhu 750°C selama 30 menit (paparan maksimal penelitian ini) sehingga melalui lokus tersebut sangat potensial dalam pemeriksaan identifikasi melalui analisis DNA terutama dalam kondisi terdegradasi efek paparan suhu tinggi, serta mempercepat proses identifikasi terutama pada kejadian bencana (*mass disaster*) maupun kasus-kasus kriminal lainnya.

**Kata kunci** : *efektivitas, degradasi DNA, mini primer, STR CODIS, suhu tinggi*

### PENDAHULUAN

Identifikasi forensik dengan pemeriksaan DNA yang dapat digunakan untuk menentukan asal usul anak; kasus paternitas; hubungan kekeluargaan; maupun identifikasi korban tak dikenal, semakin hari semakin diakui keberadaannya dalam menunjang penegakan hukum di tanah air. Hal ini terbukti dengan diakuinya pemeriksaan yang ditemukan oleh Sir Alec Jeffrey ini sebagai alat bukti di pengadilan negeri maupun pengadilan agama sejak tahun 1997 [1]. Bahkan untuk keperluan identifikasi korban bom Bali tahun 2002 yang lalu, identifikasi dengan menggunakan pemeriksaan

DNA terhadap para korbannya ini, mengambil peranan yang sangat signifikan.

Hanya saja dalam perkembangannya pemeriksaan dengan menggunakan bahan DNA ini bukannya tanpa persoalan. Salah satu persoalan yang seringkali menjadi masalah yang serius bagi ahli DNA forensik maupun ahli DNA lainnya adalah kondisi DNA yang terdegradasi atau yang dikenal dengan istilah *degraded DNA* [2].

Salah satu alternatif yang ditempuh dalam degradasi DNA saat ini oleh ahli DNA forensik adalah melalui penggunaan mini primer set, yakni melalui metode pengurangan ukuran

STR assays, pada pemeriksaan lokus DNA inti [3].

Penelitian ini menggunakan perlakuan suhu rerata pada penelitian S.Thanakum (1999) yakni 500°C dan penelitian Sosiawan (2007) yakni 750°C serta rentang waktu 20 menit merupakan waktu tertinggi penelitian S.Thanakum dan rentang waktu 30 menit waktu tertinggi penelitian Sosiawan.

Meski demikian sampai saat ini belum ada penelitian yang spesifik tentang keberhasilan penggunaan *mini primer set* sebagai cara alternative untuk identifikasi DNA forensik dengan menggunakan DNA yang telah terdegradasi atau *degraded DNA* khususnya pada DNA inti. Hal ini diperlukan untuk dapat menentukan lokus-lokus (terutama lokus CSF1PO, FGA dan D21S11) yang sangat potensial digunakan untuk pemeriksaan *degraded DNA*.

Tujuan penelitian mengetahui nilai efektifitas penggunaan *mini primer set* DNA inti pada lokus CSF1PO, FGA dan D21S11 pada DNA yang diduga telah mengalami degradasi dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

#### METODE PENELITIAN

Jenis Penelitian eksperimental laboratories dan rancangan penelitian *randomized post test only control group design*. Sampel penelitian gigi molar dua dari jenazah T4 sebanyak 16 buah gigi. Variabel penelitian yakni variabel tergantung : mini STR CODIS lokus FGA, CSF1PO & D21S11, variabel bebas : paparan suhu 500°C dan 750°C selama 20 menit dan 30 menit. Bahan penelitian *DNAzol Reagent*, *ethanol* 100% -70%, PCR Mix, Nuclease Free water, Agarose, *Tris Boric EDTA* 0,5%, *Marker* 100 bp dan bromphenol blue 0,03%, *mini primer* STR CODIS:

*mini* CSF1PO (*Promega Primer*, *Gen Bank Accession X14720*)

5'-  
ACAGTAACTGCCTTCATAGATAG-3'  
5'-  
GTGTCAGACCCTGTTCTAAGTA-3'

*mini* FGA (*Promega primer*, *Gen Bank Accession M64982*)

5'-  
AAATAAAATTAGGCATATTTACAAGC-3'  
5'-  
GCTGAGTGATTTGTCTGTAATTG-3'

*mini* D21S11 (*Promega primer*, *Gen Bank Accession AP000433*)

5'-  
ATTCCCCAAGTGAATTGC-3'  
5'-  
GGTAGATAGACTGGATAGACGA-3'

Prosedur Pengumpulan Data :

1. Proses dekalsifikasi Gigi Molar Dua

Gigi yang terpapar suhu 500°C, 750°C selama 20–30' (menit), dibuat bubuk dengan mortar, dimasukkan 1 gram dalam tabung *eppendorf*, didekalsifikasi dengan 40 ml larutan EDTA 0,5 M pH 7,5, divortex kemudian disonikasi 15' dan sentrifuse 2000 rpm 15'. Proses ini dimonitor dengan larutan ammonium oksalat jenuh diteteskan pada larutan DNA dalam EDTA, bila tetap jernih proses dekalsifikasi dihentikan, kemudian *pelet* dicuci dengan 40 ml *deionized H<sub>2</sub>O* steril, sentrifuse 2000 rpm 15', setelah itu supernatan dibuang. Proses pencucian ini diulang 3 kali, untuk memastikan bahwa sisa bahan dekalsifikasi telah bersih dari sampel yang akan diekstraksi DNANYA.

2. Ekstraksi DNA bercak keringat dan darah dengan DNAzol Reagent :

Pelet dari hasil dekalsifikasi ditambah 1 ml DNAzol Reagent, vortex, inkubasi 5' suhu kamar. Di *centrifuge* 10.000 rpm dalam 10' suhu 4°C, *viscous supernatant* dipindahkan tabung baru serta ditambahkan 0,5 ml 100% ethanol (*absolute*), di bolak-balik, inkubasi suhu kamar 1'-3', *centrifuge* 4000 rpm 1'-2' suhu 4°C. Supernatan dibuang dengan hati-hati agar DNA (*pelet*) tidak ikut terbuang. *Pelet* dicuci 0,8-1 ml 75% ethanol sebanyak 2 kali dan setiap kali pencucian tabung dibolak-balik sebanyak 3-6 kali. Tabung diletakkan pada posisi tegak selama 0,5' – 1' dan ethanol 75% dibuang dengan cara *pipeting* atau *decanting*. *Pellet* dikeringkan dengan cara membiarkan tabung terbuka 5''–15'' (detik). *Pelet* yang berisi DNA tersebut dilarutkan 25 µl *Distilled water*, vortex secukupnya, simpan pada suhu -20°C.

Amplifikasi PCR : *mini primer* FGA, CSF1FO & D21S11 [5],[6]:

	<i>Initial</i>	<i>denaturation</i>
95°C selama 10'	(30 kali )	<i>Denaturation</i>
94°C selama 1'		<i>Annealing</i>
55°C selama 1'		<i>Extension</i>
72°C selama 1'		

65°C selama 45' *Final* *Extension*

Prosedur Pembuatan *Agarose Gel* 2%: campuran 40 ml TBE 0,5X dengan 0,8 gram agarose dalam tabung erlenmeyer, aduk sekitar 15 menit, dioven (60-64°C) sampai tidak ada agarose yang menempel di dinding tabung. Tuangkan dalam cetakan elektroforesis yang sebelumnya telah

Elektroforesis menggunakan agarose gel 2%.

diletakan sisir, tunggu sampai agar tersebut membeku. Bila agar sudah membeku tuang TBE merata di atasnya dan angkat sisir tersebut hati-hati.

**HASIL PENELITIAN**

Sampel dari bahan gigi (gigi molar dua) yang diambil dari jenazah T4, dilakukan pengukuran

berat bahan sebelum dan sesudah perlakuan, hasil rerata berat bahan gigi sebelum dan sesudah perlakuan seperti berikut dibawah ini :

**Tabel 1.** Hasil rerata pengukuran berat bahan gigi sebelum dan sesudah perlakuan (paparan suhu tinggi).

Rerata berat bahan gigi (gram)			
Sebelum perlakuan		Setelah Perlakuan	
2.8	500 °C	20'	2.0
2.4		30'	1.4
2.7	750 °C	20'	1.7
2.5		30'	1.3

Tabel 1 menunjukkan adanya penurunan berat bahan gigi akibat perlakuan, dari sebelum

perlakuan 50-60% penurunannya. Berikut ini rerata kadar DNA dari bahan gigi, sebagaimana dapat dilihat tabel 3.2.

**Tabel 2.** Rerata kadar DNA hasil isolasi dari bahan gigi

Paparan (°C)	Kadar DNA Gigi (x ± SD) ng/µl
Tanpa Paparan	269.25 ± 10.25
500°C	20' 147.32 ± 9.07 <sup>1,2,3</sup>
	30' 128.40 ± 5.41 <sup>1,4,5</sup>
750°C	20' 110.37 ± 9.51 <sup>2,4,6</sup>
	30' 72.18 ± 3.09 <sup>3,5,6</sup>

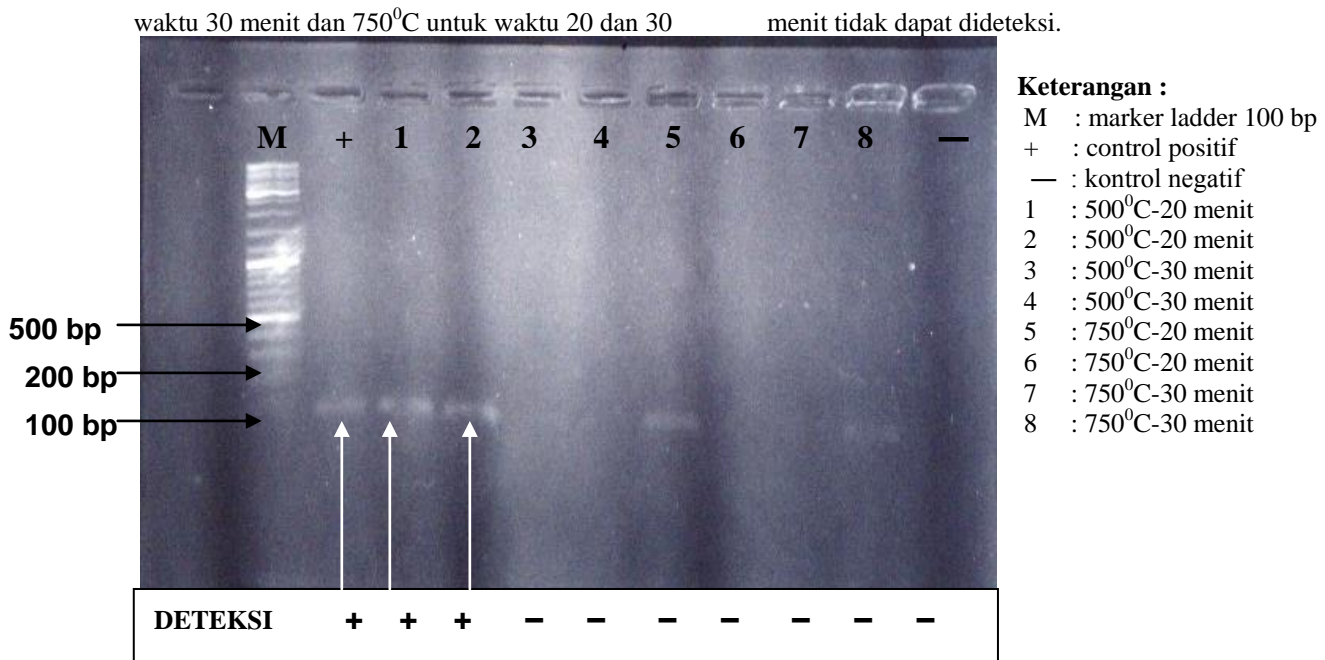
Keterangan : X : rata-rata kadar DNA, SD : Standar Deviasi  
 Tanda <sup>1,2,3,4,5,6</sup> : angka yang sama pada setiap lajur menunjukkan perbedaan yang signifikan (p<0.05)

Tabel 2 menunjukkan adanya penurunan kadar DNA dari bahan gigi melalui paparan suhu tinggi. Dapat dinyatakan bahwa semakin tinggi suhu yang dipaparkan pada bahan gigi maka terjadi penurunan kadar DNA bahan gigi tersebut. Hasil uji ANOVA menunjukkan terdapat pengaruh perlakuan terhadap penurunan kadar DNA bahan (nilai yang didapat sig: 0.000, batas signifikan p<0.05). Hasil uji t menunjukkan perbandingan kadar DNA bahan tulang yang berbeda bermakna (batas signifikan jika nilai p<0.05) diantara paparan suhu : 500°C-20 menit : 500°C-30 menit ; 500°C-20 menit : 750°C-20 menit ; 500°C-20 menit : 750°C-30 menit ; 500°C-30 menit : 750°C-20 menit ; 500°C-30 menit : 750°C-30 menit ; 750°C-20 menit : 750°C-30 menit.

**Efek paparan suhu tinggi pada DNA bahan gigi lokus FGA, CSF1PO & D21S11 dengan mini primer set**

Berikut dibawah ini beberapa gambar hasil elektroforesis dengan agarose gel 2% pada lokus STR CODIS dengan *mini primer* hasil PCR pada kondisi terpapar suhu 500°C untuk waktu 20 dan 30 menit; 750°C untuk waktu 20 dan 30 menit. Gambar 1 hasil PCR lokus FGA visualisasi elektroforesis agarose gel 2% dalam sampel bahan gigi.

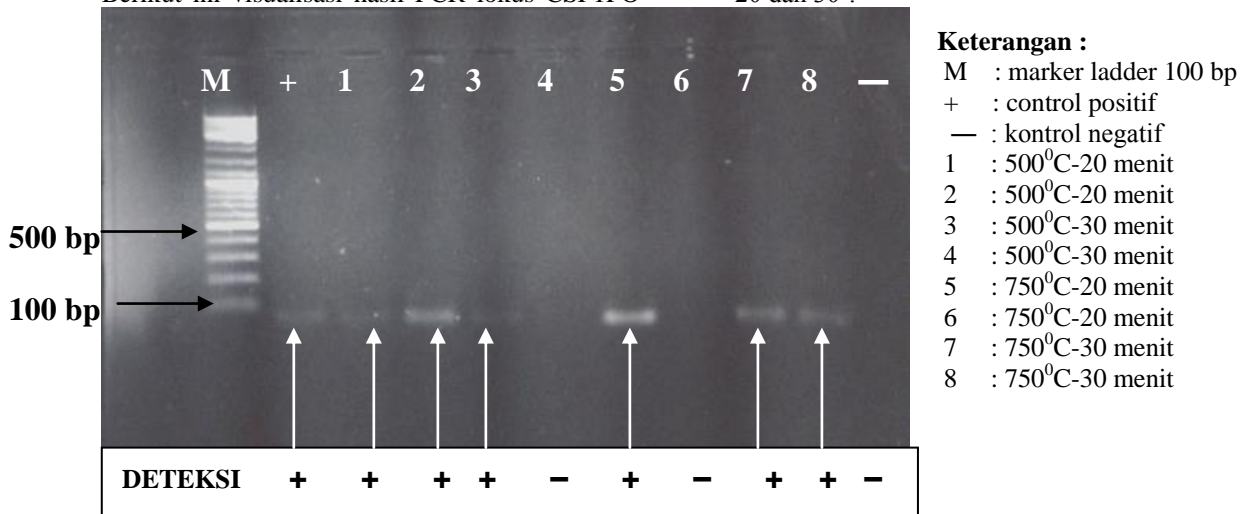
Visualisasi hasil PCR lokus FGA pada DNA bahan gigi dengan *mini primer* gambar 5.3, menunjukkan paparan suhu 500°C untuk waktu 20 menit masih dapat dideteksi dalam rentang antara 118-170 bp, sedangkan suhu 500°C untuk



**Gambar 1.** Visualisasi hasil PCR lokus FGA dengan *mini primer* pada bahan gigi.

Visualisasi hasil PCR gambar 1, menunjukkan hanya paparan suhu 500°C-20' dapat dideteksi dalam rentang antara 118-170 bp. Berikut ini visualisasi hasil PCR lokus CSF1PO

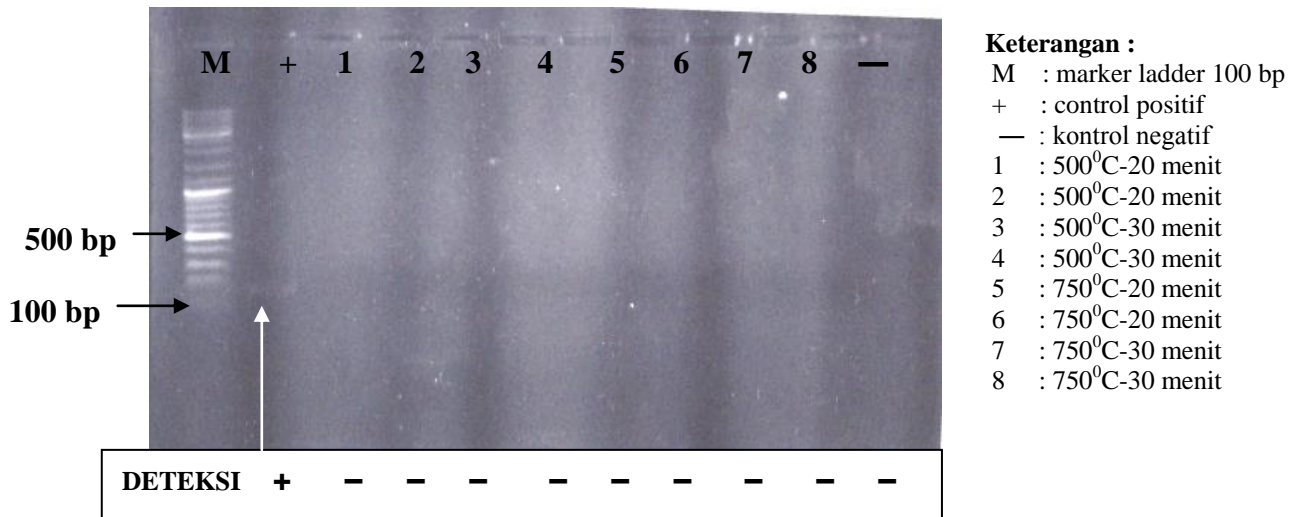
bahan gigi menggunakan agarose gel 2% pada *mini primer* dalam kondisi terpapar suhu 500°C untuk waktu 20 dan 30' serta 750°C untuk waktu 20 dan 30'.



**Gambar 2.** Visualisasi hasil PCR lokus CSF1PO dengan *mini primer* pada bahan gigi.

Visualisasi hasil PCR gambar 2, menunjukkan pada paparan suhu 500°C untuk waktu 20 dan 30 menit serta suhu 750°C untuk waktu 20 dan 30 menit masih dapat dideteksi dalam rentang antara 89-129 bp. Berikut ini

visualisasi hasil PCR lokus D21S11 bahan gigi menggunakan agarose gel 2% dengan *mini primer* dalam kondisi terpapar suhu 500°C dan 750°C masing-masing untuk waktu 20 dan 30 menit.



**Gambar 3.** Visualisasi hasil PCR lokus D21S11 dengan *mini primer* pada bahan gigi.

Visualisasi hasil PCR gambar 3, menunjukkan paparan suhu 500<sup>0</sup>C untuk waktu 20 menit sampai dengan paparan suhu 750<sup>0</sup>C untuk waktu 30 menit tidak dapat dideteksi dalam rentang antara 153-221 bp.

Hasil lengkap pemeriksaan deteksi lokus FGA, CSF1PO dan D21S11 pada bahan gigi dengan *mini primer* sebagai efek paparan suhu tinggi, tabel berikut ini :

**Tabel 3.** Hasil deteksi DNA pada STR CODIS efek paparan suhu tinggi terhadap DNA bahan gigi dalam berbagai perlakuan suhu serta lama paparan, pada lokus FGA, CSF1PO dan D21S11

Paparan	FGA		CSF1PO		D21S11		Total (% hasil +)	
	Hasil deteksi		Hasil deteksi		Hasil deteksi			
	+	-	+	-	+	-		
500 <sup>0</sup> C	20'	2	2	4	0	0	4	<b>50 %</b>
	30'	2	2	2	2	0	4	<b>50 %</b>
750 <sup>0</sup> C	20'	1	3	2	2	0	4	<b>25 %</b>
	30'	0	4	1	3	0	4	<b>8.5 %</b>
Total DNA + setelah paparan (%)		<b>5/16 31.25%</b>		<b>9/16 (56.25%)</b>		<b>0%</b>		

Tabel 3. menunjukkan bahwa pada pemeriksaan STR terhadap DNA bahan gigi melalui lokus FGA paparan suhu 500<sup>0</sup>C untuk waktu 20 dan 30 menit serta 750<sup>0</sup>C untuk waktu 20 menit masih dapat dideteksi (31.25% sampel) sedangkan lokus CSF1PO pada paparan suhu 500<sup>0</sup>C untuk waktu 20 menit sampai 750<sup>0</sup>C untuk waktu 30 menit masih dapat dideteksi (56.25%). Untuk lokus D21S11 pada paparan suhu 500<sup>0</sup>C untuk waktu 20 menit sampai paparan suhu 750<sup>0</sup>C untuk waktu 30 menit tidak dapat dideteksi

**PEMBAHASAN**

Kadar DNA merupakan faktor penting dalam pemeriksaan DNA forensik yakni erpengaruh terhadap keberhasilan STR

*genotyping* pada sampel-sampel DNA. Penurunan kadar DNA hingga 1 ng berpotensi terhadap penurunan kemampuan deteksi *short tandem repeat* (STR) hingga 95% [7]. Kadar DNA minimal yang dibutuhkan pada pemeriksaan DNA forensik masing-masing sebesar 50 ng dan 20 ng, sedangkan Butler (2005), kadar DNA dalam pemeriksaan STR minimal 0.5-2.5 ng [8],[9].

Disamping kadar DNA sampel pada pemeriksaan DNA berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) juga dibutuhkan kualitas DNA yang mencukupi. Kualitas DNA yang dimaksud yakni bahwa DNA yang digunakan dalam analisis harus dalam kondisi yang belum terdegradasi. Jika DNA mengalami degradasi parah

mengakibatkan primer tidak dapat menempel pada DNA target yang akan digandakan [10],[11],[12]. 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 [12].

Kerusakan DNA yang disebabkan oleh paparan-paparan yang abnormal contohnya temperatur yang tinggi disebabkan oleh rusaknya ikatan hidrogen DNA yang *irreversible*. Kondisi ini mengakibatkan kerusakan pasangan purin-primidin pada DNA, di mana pasangan purin-primidin ini merupakan komponen utama pada struktur DNA [13].

Penelitian ini menggunakan sampel yang berasal dari jenazah yang berstatus tempat tinggal tidak tetap (T4). Kerusakan sampel DNA setelah kematian yang merupakan proses *endogenous* sudah dimulai sejak kematian. Terjadinya kerusakan DNA bisa bersamaan dengan proses pembusukan, yakni melalui *autolysis* dan bakteri.

Kerusakan DNA pada *post mortem* (jenazah) sebagai akibat proses *autolysis* dapat berupa : *pyrimidine modification*, *baseless sites*, *intermolecular crosslinks* dan *low molecular weight* dari DNA oleh karena *strand breakage* [12,13].

Hasil penelitian ini hanya lokus CSF1PO dengan *mini primer* menunjukkan masih terdeteksi pada paparan suhu 750°C untuk waktu 30 menit yang merupakan suhu maksimal dalam penelitian ini. Hal ini menunjukkan bahwa pada pemeriksaan DNA bahan gigi melalui deteksi lokus STR didapatkan respon deteksi yang berbeda pada berbagai paparan suhu tinggi yang telah diberikan pada sampel gigi.

Gigi juga memiliki 'mineral hard tissue' yang lebih lengkap. Mineral tersebut yang dikenal dengan *apatites* sebagian besar berupa *hydroxyapatite*. Disamping itu gigi memiliki mineral sekunder yang penting, dimana kandungan di gigi lebih tinggi daripada tulang, yakni : *Calcite*, *limonite*, *pyrite* dan *vivianite*, sehingga gigi memiliki suatu ketahanan atau perlindungan yang kuat [10].

Penggunaan *mini primer* merupakan alternatif sebagai pengganti *primer* standar dalam kondisi DNA mengalami degradasi, dimana dengan penggunaan *primer* standar pada kondisi tersebut, tingkat keberhasilannya rendah. *Mini primer* merupakan redesign *primer* yakni mengurangi *amplicon size* dengan cara menggeser posisi *primer* sedekat mungkin dengan daerah

perulangan [12]. *Mini primer* merupakan pilihan alternatif yang lebih menarik untuk keperluan analisis forensik pada DNA yang terdegradasi dibandingkan dengan analisis forensik dengan menggunakan *mtDNA*.

Keberhasilan deteksi lokus tersebut ditunjang oleh adanya perbedaan *amplicon product*, kandungan GC atau ikatan guanin-sitosin pada masing-masing lokus. Kandungan GC memiliki tingkat kestabilan yang tinggi terhadap denaturasi dibandingkan dengan ikatan antara adenin dan timin [12].

Hasil perhitungan rasio kandungan GC mempunyai nilai yang bermakna. Dari lokus-lokus yang diteliti, rasio *GC content* dalam *primer* adalah sebagai berikut lokus CSF1PO : 42.6%, FGA :35.7%, D21S11 : 34.1%. Disamping itu, adanya deretan adenin (*consecutive adenine*) merupakan target potensial untuk kerusakan DNA yang disebabkan paparan suhu panas. Adenin merupakan basa yang paling mudah teroksidasi [12] ,13].

Hambatan/kendala yang dihadapi dalam pelaksanaan penelitian ini yakni: belum homogenya sampel yang didapat, hal ini akibat sedikitnya/terbatasnya jumlah jenazah yang berstatus T4 (tempat tinggal tidak tetap). Disamping itu juga jangka waktu inden pemesanan primer yang lama.

## KESIMPULAN

Lokus CSF1PO yang masih terdeteksi dengan *mini primer* pada paparan suhu 750°C selama 30 menit sehingga melalui lokus tersebut sangat potensial dalam pemeriksaan identifikasi melalui analisis DNA terutama dalam kondisi terdegradasi efek paparan suhu tinggi, serta mempercepat proses identifikasi terutama pada kejadian bencana (*mass disaster*) maupun kasus-kasus kriminal lainnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Atmaja.D. S, 2005. Peranan sidik jari DNA pada bidang kedokteran forensik; Materi Workshop DNA fingerprinting; UGM, Yogyakarta.
- [2] B. Budowle, F.R. Bieber, 2005. Forensic aspects of mass disasters: strategic considerations for DNA-based human identification, *Legal Med.* (Tokyo) 7 230–243.
- [3] C L Wickham, M Boyce et al 2000. Amplification of PCR products in excess of 600 base pairs using DNA extracted from decalcified, paraffin wax embedded bone

- marrow trephine biopsies *J Clin Pathol: Mol Pathol*;53:19–23
- [4] Edward M. Golenberg, Ann Bickel and Paul Weihs, 1996.Effect of highly fragmented DNA on PCR, *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, No. 24
- [5] Gill, P., J. Whitaker. 2010. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *For. Sci. Int.* 112:17–40.
- [6]Gill P., D.J. Werrett, et al 2014. An assessment of whether SNPs will replace STRs in national DNA databases—joint considerations of the DNA working group of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and the Scientific Working group on DNA Analysis Methods (SWGDM), *Sci. Just* 44 51–53.
- [7] Hofreiter, M., Serre, D.. 2001, Ancient DNA. *Nat. Rev. Gen.* 2, 353–359.
- [8] Joachim Burger, Susanne Hummel, Bernd Herrmann, Winfried Henke, 1999. DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains, *Electrophoresis*, 20, 1722- 728
- [9] John M. Butler; Yin Shen; and Bruce R. McCord, 2004. The Development of Reduced Size STR Amplicons as Tools for Analysis of Degraded DNA, *National Institute of Standards and Technology*
- [10]Kusuma SE, Sosiawan A, 2004, Efek temperature ekstrim pada DNA inti dan DNA mitokondria, Penelitian pendahuluan, *LPPM UNAIR*.
- [11] L.A. Dixon, A.E. Dobbins, H.K. et al. Gill, 2005.Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs—results of a collaborative European (EDNAP) exercise; *Forensic Science International* xxx (2005) xxx–xxx
- [12] Muladno, 2002. Seputar teknologi rekayasa genetika, Bogor: **Pustaka Wirausaha Muda**, Edisi pertama.
- [13]Paabo, S.1989. Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. Proc. *Natl. Acad. Sci.* 86, 1939–1943.