

**PERBEDAAN HASIL PREPARASI FRAGMEN DNA MITOKONDRIAL DAN  
DNA INTI PADA SAMPEL URIN SIMPAN  
UNTUK KEPENTINGAN IDENTIFIKASI PERSONAL**



Tesis  
Untuk memenuhi sebagian persyaratan  
Mencapai derajat S-2

Magister Ilmu Biomedik

Oleh :

Arif Rahman Sadad  
G 4A.002.040

PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2004

**PERBEDAAN HASIL PREPARASI FRAGMEN DNA MITOKONDRIAL DAN  
DNA INTI PADA SAMPEL URIN SIMPAN  
UNTUK KEPENTINGAN IDENTIFIKASI PERSONAL**



Tesis  
Untuk memenuhi sebagian persyaratan  
Mencapai derajat S-2

Magister Ilmu Biomedik

Oleh :

Arif Rahman Sadad  
G 4A.002.040

PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2004

**TESIS**

**PERBEDAAN HASIL PREPARASI FRAGMEN DNA MITOKONDRIAL DAN  
DNA INTI PADA SAMPEL URIN SIMPAN  
UNTUK KEPENTINGAN IDENTIFIKASI PERSONAL**

Di susun oleh

Arif Rahman Sadad  
G 4A.002.040

telah dipertahankan di depan Tim Penguji  
pada tanggal 28 September 2004  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,  
Komisi Pembimbing :

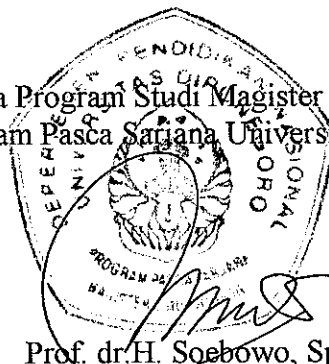
Pembimbing Utama

dr. Sofwan Dahlan, Sp.F  
NIP : 130 368 065

Pembimbing kedua

dr. Pudjadi, SU  
NIP : 130 530 278

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik  
Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro



Prof. dr. H. Soebowo, Sp.PA(K)  
NIP : 130 352 549

PT-PUSTAK-UNDIP
No. Hart: 3806.1/1m13/et
gl. : 17 Juni 05

## PERNYATAAN

Denagn ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh berasal dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, September 2004

dr. Arif Rahman Sadad  
NIM. G 4A 002040

## DAFTAR RIWAYAT HIDUP

Nama : dr. Arif Rahman Sadad  
NIM / NIP : G 4A 002 040  
Tempat / Tanggal lahir : Grobogan, 20 Pebruari 1970  
Agama : Islam  
Jenis Kelamin : Laki – laki  
Alamat : Jl. Indraprasta no 41 Semarang

### Riwayat Pendidikan

1. SD : 1983  
2. SMP : 1986  
3. SMA : 1989  
4. FK UNDIP : 1996

### Riwayat Pekerjaan

1. : Dokter di Rumah Sakit Simpangan, Depok  
2. : Dokter PTT di Puskesmas Undaan, Kudus  
3. : -

### Riwayat Keluarga

Nama Istri / suami : dr. Nyoman Suci Widyastiti, M.Kes  
Nama orang tua ayah : Dluha, BA  
Ibu : Sri Nurhayati  
Alamat orang tua / wali : Tegowanu Kulon, RT 07 / I, Grobogan  
Nama anak : 1. Daniswara Raditya Rahman  
2. Prajneshwara Rahardhika Rahman  
3. Argyareshwara Davindra Rahman

## KATA PENGANTAR

Puji syukur dan terima kasih penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Pengasih atas anugerahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “Perbedaan hasil preparasi fragmen DNA mitokondrial dan DNA inti pada urin simpan untuk kepentingan Identifikasi Personal “, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh derajat sarjana S2 di bidang Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.

Penulis menyadari bahwa penelitian dan penulisan ini tidak akan mampu penulis selesaikan dengan baik tanpa bantuan berbagai pihak. Khusus kepada dr. Sofwan Dahlan, SpF sebagai dosen pembimbing utama dan dr. Pudjadi, SU sebagai dosen pembimbing kedua, penulis mengucapkan terima kasih atas segala bimbingan, sumbangan pemikiran, waktu serta dorongan semangat dalam penulisan karya akhir ini.

Dalam kesempatan ini penulis juga menghaturkan terima kasih setulus-tulusnya kepada :

1. Rektor Universitas Diponegoro di Semarang yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis dan Program Pasca Sarjana program studi Magister Ilmu Biomedik.
2. dr. Kabul Rachman , SpKK ( K ) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yang telah memberi kesempatan mengikuti Pendidikan Dokter Spesialis dan Program Pasca Sarjana program studi Magister Ilmu Biomedik.
3. Prof.dr.H. Soebowo, SpPA ( K ), selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang, yang telah

memberikan kesempatan kepada kami untuk menempuh pendidikan derajat sarjana S2 di bidang Ilmu Biomedik.

4. dr. Maryono, SpF, kepala bagian Ilmu Kedokteran Forensik FK. UNDIP dan semua staff di bagian Ilmu Kedokteran Forensik FK. UNDIP yang memberikan dukungan dan dorongan semangat selama penulis mengikuti pendidikan dokter spesialis.
5. dr. Soeharsono, SpOG Ketua Program Pendidikan Dokter Spesialis Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yang telah memberi kesempatan mengikuti program pendidikan dokter spesialis.
6. dr. Edi Dharmana, PhD yang telah menyediakan waktu untuk memberikan petunjuk dan senantiasa memberikan dorongan semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
7. dr. Kusmiyati M.Kes, semua staf pengajar dan karyawan Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program pasca sarjana Universitas Diponegoro Semarang yang telah menyediakan waktu untuk memberikan petunjuk dan arahan terutama saat pembuatan/ perbaikan tesis ini.
8. Drg. Henry Setiawan MSc dan Farida Aprilianingrum, SKM yang telah memberikan bimbingan dan saran dalam analisis statistik dan metodologi penelitian.
9. Tim penguji dan nara sumber proposal dan penguji tesis yang telah berkenan memberi masukan dan arahan dalam penelitian dan penulisan tesis ini.
10. Pimpinan Laboratorium Forensik Fakultas Kedokteran UNDIP dan Pimpinan Laboratorium Parasitologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta, beserta staf analis

laboratorium : Ibu Atin dkk yang mendampingi penulis selama pelaksanaan penelitian.

11. Istri, ibu dan ayah, mertua serta ketiga anakku tercinta yang penuh pengertian serta senantiasa mendoakan dan memberikan dorongan semangat agar penulis dapat menyelesaikan penulisan proposal, penelitian, penulisan tesis dan menyelesaikan pendidikan magister.
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang telah memberikan andil yang besar dalam penulisan tesis ini.

Akhir kata, penulis yakin bahwa tulisan ini masih banyak kekurangan, karenanya sangat diharapkan saran serta kritik demi kesempurnaan tulisan ini. Penulis berharap agar penelitian ini secara luas berguna bagi pembaca, masyarakat dan berguna pula untuk kemajuan kesehatan dan ilmu pengetahuan khususnya bidang Forensik di Indonesia.

Semarang, September 2004

Penulis



## DAFTAR ISI

Halaman judul .....	i
Halaman pengesahan .....	ii
Pernyataan .....	iii
Daftar riwayat hidup .....	iv
Kata pengantar .....	v
Daftar isi .....	viii
Daftar tabel .....	x
Daftar gambar .....	xi
Daftar singkatan .....	xii
Daftar lampiran .....	xiii
<b>BAB 1 : PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar belakang permasalahan .....	1
1.2 Rumusan masalah .....	4
1.3 Tujuan penelitian .....	4
1.3.1. Tujuan umum .....	4
1.3.2. Tujuan khusus .....	4
1.4 Manfaat penelitian .....	
1.4.1. Bagi pengembangan ilmu pengetahuan .....	5
1.4.2. Bagi kepentingan masyarakat .....	5
<b>BAB 2 : TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Identifikasi personal	
2.1.1. Identifikasi personal konvensional .....	6
2.1.2. Identifikasi personal modern .....	8
2.2 DNA inti	
2.2.1. Struktur DNA inti..... ..	10
2.2.2. DNA inti untuk identifikasi personal .....	12
2.3 DNA mitokondrial	
2.3.1 Struktur DNA mitokondrial .....	15
2.3.2 DNA mitokondrial untuk identifikasi personal .....	17
2.4 Urin untuk identifikasi personal	
2.4.1 Fisiologi dan macam sampel urin .....	20
2.4.2 Pemeriksaan DNA inti pada urin .....	21
2.4.3 Pemeriksaan DNA mitokondrial pada urin .....	22
<b>BAB 3 : KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS</b>	
3.1 Kerangka teori .....	23
3.2 Kerangka konseptual .....	24
3.3 Hipotesis .....	24
<b>BAB 4 : METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Rancangan Penelitian .....	25
4.2 Populasi dan sampel	
4.2.1 Populasi .....	25
4.2.2. Sampel .....	
4.2.2.1 Besar sampel .....	25
4.2.2.2 Kriteria sampel .....	26

4.2.2.3 Cara pengambilan sampel .....	26
4.3 Variabel Penelitian dan definisi	
4.3.1 Variabel penelitian	
4.3.1.1. Variabel bebas .....	27
4.3.1.2. Variabel tergantung .....	27
4.3.2. Definisi operasional .....	27
4.4 Bahan dan Alat penelitian	
4.4.1 Bahan penelitian .....	28
4.4.2 Alat / instrumen penelitian .....	28
4.5 Prosedur pengumpulan data .....	29
4.6 Lokasi penelitian	
4.6.1 Lokasi penelitian .....	31
4.7 Skema kerja .....	32
4.8 Analisis data .....	33
BAB 5 : HASIL PENELITIAN.....	34
5.1 Data dasar .....	34
5.2 Analisis univariat .....	38
5.3 Analisis bivariat .....	41
5.4 Uji kappa .....	44
5.5 Analisis lanjut .....	44
BAB 6 : PEMBAHASAN .....	45
6.1 Hasil preparasi fragmen nDNA darah .....	45
6.2 Hasil preparasi fragmen nDNA urin simpan .....	45
6.3 Hasil preparasi fragmen mtDNA darah .....	47
6.4 Hasil preparasi fragmen mtDNA urin simpan .....	47
6.5 Perbedaan hasil preparasi fragmen nDNA dibanding mtDNA urin simpan .....	47
BAB 6 : KESIMPULAN DAN SARAN .....	49
DAFTAR PUSTAKA .....	50
LAMPIRAN .....	55

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Perbedaan nDNA dan mtDNA manusia .....	16
Tabel 5.1 Data dasar penelitian .....	34
Tabel 5.2 Distribusi frekuensi hasil preparasi fragmen identifikasi personal dari DNA inti sampel darah dan urin simpan .....	38
Tabel 5.3 Distribusi frekuensi hasil preparasi fragmen identifikasi personal dari DNA mitokondrial sampel darah dan DNA mitokondrial urin simpan ..	40
Tabel 5. 4 Distribusi silang hasil preparasi fragmen mtDNA dan nDNA darah dengan mtDNA dan nDNA urin simpan .....	42
Tabel 5. 5 Distribusi silang hasil preparasi fragmen DNA mitokondrial dengan DNA inti urin simpan. ....	43

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur DNA inti .....	12
Gambar 2.2. Metode RFLP .....	13
Gambar 2.3. Skema prosedur DNA typing .....	14
Gambar 2.4. Peta gen pada mtDNA manusia .....	16
Gambar 2.5. Tampilan skematik molekul mtDNA serta contoh minisekuencing .....	18
Gambar 5.1. Hasil preparasi fragmen nDNA darah untuk kepentingan identifikasi personal .....	35
Gambar 5.2. Hasil preparasi fragmen nDNA darah untuk kepentingan identifikasi personal .....	35
Gambar 5.3. Hasil preparasi fragmen nDNA urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal .....	36
Gambar 5.4. Hasil preparasi fragmen nDNA urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal .....	36
Gambar 5.5. Hasil preparasi fragmen mtDNA darah untuk kepentingan identifikasi personal .....	37
Gambar 5.6. Hasil preparasi fragmen mtDNA darah untuk kepentingan identifikasi personal .....	37
Gambar 5.7. Hasil preparasi fragmen mtDNA urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal .....	37
Gambar 5.8. Hasil preparasi fragmen mtDNA urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal .....	37

## DAFTAR SINGKATAN

DNA	: Deoxyribonucleic Acid
nDNA	: nuclear DNA, DNA inti
mtDNA	: mitochondrial DNA, DNA mitokondrial
D-loop	: displacement-loop
RFLP	: Restriction Fragment Length Polimorphism
PCR	: Polymerase Chain Reaction
VNTR	: Variable Number Short of Tandem Repeats
STR	: Short Tandem Repeats
RNA	: Ribonucleic Acid
rRNA	: ribosomal Ribonucleic Acid
tRNA	: transfer Ribonucleic Acid
NADH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide
HVR	: Hypervariable
CD4	: Cluster of Differentation 4

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Persetujuan penelitian .....	55
Lampiran 2. Prosedur isolasi DNA darah .....	56
Lampiran 3. Prosedur isolasi DNA urin .....	58
Lampiran 4. Prosedur PCR .....	59
Lampiran 5. Prosedur elektroforesis gel .....	60
Lampiran 6. Hasil analisis statistik .....	61

## ABSTRAK

Arif Rahman S, Pudjadi, Sofwan Dahlan

### PERBEDAAN HASIL PREPARASI FRAGMEN DNA MITOKONDRIAL DAN DNA INTI PADA SAMPEL URIN SIMPAN UNTUK KEPENTINGAN IDENTIFIKASI PERSONAL

**Latar belakang :** Identifikasi seseorang pada berbagai kasus forensik dapat menggunakan cara konvensional maupun modern ( DNA typing ). Pemeriksaan DNA mempunyai keunggulan karena DNA bersifat lebih stabil dibanding metode petanda genetik konvensional ( misalnya golongan darah ), dan kode genetik DNA pada setiap individu pasti berbeda, kecuali pada kembar identik. Identifikasi personal dengan menggunakan sampel urin akhir-akhir ini mulai memegang peran cukup penting. Pada kasus doping dan pemeriksaan narkoba yang menggunakan sampel urin dengan hasil yang positif seringkali terjadi pengingkaran oleh pengguna. Selain DNA inti, pada tahun 1981 ditemukan DNA mitokondrial ( mtDNA ), yaitu DNA yang terdapat pada mitokondria. Setiap sel mempunyai 1000 hingga 10.000 *copy* mtDNA, sehingga mtDNA dapat ditemukan pada sampel yang sangat sedikit termasuk diantaranya adalah sampel urin.

**Metoda :** Dilakukan studi cross – sectional analitik dengan melibatkan 12 responden terpilih ( 7 perempuan dan 5 laki-laki ) dari semua golongan umur yang diambil sampel urin untuk dilakukan preparasi fragmen DNA ( mtDNA dan nDNA ) dan dilakukan pengambilan darah sebagai sampel referensi ( baik mtDNA maupun nDNA ). Dilakukan diskripsi perbedaan hasil preparasi fragmen mtDNA dan nDNA ( baik darah maupun urin ), kemudian dianalisis perbedaan hasil preparasi fragmen mtDNA dibanding nDNA pada sampel urin.

**Hasil :** Didapatkan hasil preparasi fragmen mtDNA dan nDNA darah sebesar 100%, mtDNA urin sebesar 83,3% dan nDNA urin sebesar 33,3%. Dari analisis perbedaan hasil preparasi fragmen mtDNA dibanding nDNA urin didapatkan 83,3%:33,3% dengan  $p=0,031$ . Sehingga hasil preparasi fragmen mtDNA urin terbukti 2,5 kali lebih tinggi dari preparasi fragmen nDNA urin.

**Simpulan :** Karena hasil preparasi fragmen mtDNA urin lebih tinggi dari preparasi fragmen nDNA urin maka pada kasus-kasus narkoba atau doping dengan urin sebagai sampelnya sebaiknya digunakan pemeriksaan mtDNA untuk mengetahui kepemilikan dari urin tersebut.

**Kata kunci :** Identifikasi personal, mtDNA, nDNA

## ABSTRACTS

Arif Rahman S, Pudjadi, Sofwan Dahlan

### DIFFERENCE OF RESULTS OF FRAGMENT PREPARATION BETWEEN MITOCHONDRIAL DNA AND NUCLEAR DNA IN STORED URINARY SAMPLES FOR PERSONAL IDENTIFICATION PURPOSE

**Backgrounds:** The identification of a person in various forensic cases may use both conventional and modern methods (DNA typing). DNA investigation has an advantage because DNA is more stable as compared with conventional genetic marker methods (for example, blood group), and DNA genetic codes are always differ from person to person, except for identical twin. Recently, personal identification by using urinary sample is beginning to play a sufficiently important role. In examinations of doping cases and narcotics abuse that are performed using urinary sample that gives positive results, the user often denies the result. Other than nuclear DNA, in 1981 the mitochondrial DNA (mtDNA) was discovered, i.e. DNA that resides in mitochondrion. Every cell has 1000 to 10,000 copies of mtDNA, so the mtDNA can be found in an extremely small amount of sample, and urinary sample is included among them.

**Methods:** An analytic cross-sectional study was performed that involved 12 selected respondents (7 females and 5 males) from all age groups, urinary samples were collected for performing DNA fragmentation (mtDNA and nDNA) and blood samples were collected as reference sample (both mtDNA and nDNA). Description of difference of mtDNA and nDNA fragment preparation results was performed (both blood and urine), then the difference of fragment preparation result between mtDNA and nDNA in the urinary samples was analysed.

**Results:** The result of blood mtDNA and nDNA fragment preparation was found to be 100%, whereas urinary mtDNA was 83,3% and urinary nDNA was 33,3%. From the analysis of difference between urinary mtDNA fragment preparation result as compared with urinary nDNA was found to be 83.3%:33.3% with  $p = 0.031$ . So the result of urinary mtDNA fragment preparation was proved to be 2.5 times higher than urinary nDNA fragment preparation.

**Conclusion:** Because the result of urinary mtDNA fragment preparation is higher than urinary nDNA fragment preparation, so in cases of narcotic abuse or doping with urine as the sample, then the mtDNA investigation should be used to find out the owner of the urine.

**Keywords:** Personal identification, mtDNA, nDNA.



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 LATAR BELAKANG PERMASALAHAN

Identifikasi seseorang pada berbagai kasus forensik, baik itu tindak pidana atau bukan dapat menggunakan berbagai cara, yaitu cara konvensional dan modern. Cara konvensional yang biasa digunakan antara lain dengan metode visual, dari pakaian dan perhiasan yang dipakai, dokumen yang ada, gigi geligi, sidik jari atau metode eksklusi untuk kasus – kasus massal. Namun cara – cara tersebut seringkali belum bisa menjawab identifikasi seseorang secara memuaskan, terutama pada korban yang tidak beridentitas, jenazah yang membusuk lanjut, korban mutilasi, atau barang bukti lain yang sudah rusak.  
(1,2,3,4,5)

Seiring dengan kemajuan ilmu biomolekuler, maka ilmu forensikpun berkembang dengan pesat. Sejak tahun 1984 berkembang cabang ilmu *forensic DNA analysis*, yang memungkinkan identifikasi personal tidak hanya menggunakan cara-cara konvensional, tetapi juga menggunakan cara modern yaitu berdasar pada kode genetik (DNA/ *Deoxyribonucleic Acid*) yang lazim dikenal sebagai *DNA typing*.<sup>(1,4,6,7)</sup>

Pemeriksaan identifikasi personal dengan menggunakan pemeriksaan DNA mempunyai keunggulan karena DNA bersifat lebih stabil dibanding metode petanda genetik konvensional ( misalnya golongan darah ), dan kode genetik DNA pada setiap individu pasti berbeda, kecuali pada kembar identik.<sup>(4,8)</sup>

Prosedur pemeriksaan DNA untuk identifikasi personal (*forensic DNA typing*), diawali dengan ekstraksi dan pemurnian DNA dari sampel. Ekstrak DNA dari sampel

tersebut kemudian diperiksa menggunakan teknik PCR *based* atau non- PCR *based*. Apabila jumlah sampel mencukupi, dapat digunakan teknik analisis non PCR *based*. Teknik non PCR *based* yang paling sering digunakan yaitu RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*) atau VNTR (*Variable Number Short of Tandem Repeats*). Kedua teknik tersebut menggunakan *marker* DNA multilokus dan membutuhkan sampel DNA segar. Sejak tahun 1980-an dikembangkan teknik PCR-*based*. Dengan menggunakan teknik tersebut, fragmen DNA pada sampel yang jumlahnya sangat sedikit dapat digandakan menggunakan primer fragmen-fragmen DNA standar yang digunakan untuk identifikasi personal. Hasil penggandaan fragmen DNA dapat terlihat berupa pembentukan pita / *band* pada gel elektroforesis. Hasil preparasi fragmen DNA untuk identifikasi personal tersebut kemudian dapat dilanjutkan dengan teknik *sequencing* untuk mencocokkan pasang basa DNA sampel dan DNA referensi. <sup>(1,5,8,9)</sup>

Pemeriksaan DNA untuk kepentingan identifikasi personal umumnya dengan pemeriksaan DNA inti / nDNA ( lazim disebut sebagai DNA saja). Sampel yang sering digunakan untuk pemeriksaan nDNA dalam proses identifikasi personal antara lain : darah, akar rambut, kuku, jaringan tubuh dan air liur, dimana darah sering digunakan sebagai sampel referensi oleh karena jumlah sel berinti pada darah ( dalam hal ini whole blood ) sangat banyak . Pemeriksaan nDNA dari sampel urin jarang dilakukan karena sel berinti pada urin normal sangat sedikit dan nDNA sulit teridentifikasi pada sampel yang sedikit, telah mengalami degradasi atau denaturasi protein. Hal ini dikarenakan hanya terdapat 2 *copy* nDNA pada setiap inti sel. <sup>(9,10,11,12)</sup>

Identifikasi personal dengan menggunakan sampel urin akhir-akhir ini mulai memegang peran cukup penting. Pada kasus doping dan pemeriksaan narkoba yang

menggunakan sampel urin dengan hasil yang positif seringkali terjadi pengingkaran oleh pengguna (probandus/ yang dicurigai) bahwa urin yang diperiksa tersebut bukan milik mereka atau tertukar. Pada kasus tersebut maka dilakukan pemeriksaan doping atau narkoba ulang pada urin yang telah diperiksa tersebut dan secara bersamaan juga dilakukan pemeriksaan kepemilikan urin. Oleh karena itu pemeriksaan kepemilikan urin lazimnya dilakukan pada urin simpan. Pada kasus-kasus tersebut identifikasi personal dengan pemeriksaan DNA dari urin simpan berperan sangat penting.<sup>(1,4,11,13,14)</sup>

Linfert (1998), menyatakan bahwa tingkat keberhasilan DNA *typing* dari sampel urin yang dibekukan (*frozen*), yang tercemar kontaminan (*E. coli*, albumin serum, glukosa, detergent dan pemutih) maupun tidak ialah 71 %, sedangkan Benecke (2001) menemukan keberhasilan DNA *typing* dari sampel urin yang telah tersimpan 24 jam pada suhu 4° C ialah 8 dari 11 sampel yang diperiksa (72,7%).<sup>(14,15)</sup>

Selain DNA inti, pada tahun 1981 ditemukan DNA mitokondrial (mtDNA), yaitu DNA yang terdapat pada mitokondria. Setiap sel mempunyai 1000 hingga 10.000 *copy* mtDNA, sehingga mtDNA dapat ditemukan pada sampel yang sangat sedikit. Salah satu keunikan mtDNA ialah pada area *Displacement Loop* (*D-loop*) yang mempunyai tingkat polimorfisme yang tinggi, yang berbeda untuk tiap individu, sehingga dapat digunakan untuk identifikasi personal, terutama identifikasi personal dimana sampel sedikit dan pada periode yang lama, misalnya dari pecahan gigi, serpihan tulang, jaringan yang sudah hancur dan air liur yang tertempel pada amplop, perangko atau batang rokok.  
(5,16,17)

Oleh karena urin sangat sedikit mengandung sel berinti, sehingga jumlah DNA yang dapat diekstraksi dari urin juga sedikit, maka hasil preparasi fragmen mtDNA pada

urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal diharapkan mempunyai tingkat keberhasilan lebih tinggi dibandingkan nDNA.

## 1.2 RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang diatas, rumusan masalah pada penelitian ini adalah apakah terdapat perbedaan hasil preparasi fragmen mtDNA dibanding pemeriksaan nDNA pada sampel urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal ?

## 1.3 TUJUAN PENELITIAN

### 1.3.1 TUJUAN UMUM

Untuk membuktikan adanya perbedaan hasil preparasi fragmen mtDNA dan nDNA pada sampel urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal.

### 1.3.2. TUJUAN KHUSUS

1. Untuk mendiskripsikan perbedaan hasil preparasi fragmen nDNA urin simpan dibanding sampel referensi ( nDNA darah ) dengan terbentuknya pita / *band* nDNA.
2. Untuk mendiskripsikan perbedaan hasil preparasi fragmen mtDNA urin simpan dibanding sampel referensi ( mtDNA darah ) dengan terbentuknya pita / *band* mtDNA.
3. Untuk menganalisis perbedaan hasil preparasi fragmen mtDNA dibanding nDNA pada urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal.

## 1.4 MANFAAT PENELITIAN

### 1.4.1. Bagi pengembangan ilmu pengetahuan

Hasil penelitian dapat dipakai sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut tentang identifikasi personal menggunakan pemeriksaan nDNA dan mtDNA pada sampel urin.

### 1.4.2. Bagi kepentingan masyarakat

Hasil penelitian ini dapat memberikan masukan bagi instansi/ lembaga yang berwenang melakukan tes urin, tentang manfaat identifikasi personal menggunakan pemeriksaan nDNA atau mtDNA untuk mencegah pengingkaran hasil pemeriksaan dan kepemilikan urin.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Identifikasi personal

Identifikasi personal dapat berarti upaya pembedaan individu satu dengan individu lainnya atau upaya untuk menentukan kepemilikan bagian tubuh, cairan tubuh, atau bagian-bagian tubuh yang lain baik yang masih bagus maupun yang sudah rusak bahkan yang sudah hancur sekalipun terhadap si empunya. <sup>(1,2)</sup>

Identifikasi personal pada dasarnya dapat dibedakan menjadi dua, yaitu identifikasi personal dengan metode konvensional dan metode modern. <sup>(1,2,3,6)</sup>

##### 2.1.1. Identifikasi personal konvensional

Identifikasi personal secara konvensional dikenal berbagai cara, yaitu : <sup>(2,3,18,19,20)</sup>

1. Metode visual, yaitu dengan memperhatikan korban secara cermat, terutama wajah, dapat dilakukan oleh orang yang mengenali korban.
2. Pakaian, yaitu pencatatan yang teliti atas pakaian, bahan yang dipakai, mode serta adanya tulisan di pakaian, seperti : merk, penjahit, dan lain sebagainya.
3. Perhiasan, dapat berupa anting-anting, kalung, gelang, serta cincin yang ada pada tubuh korban, khususnya bila pada perhiasan-perhiasan tersebut terdapat inisialnya.
4. Dokumen, dapat berupa Kartu Tanda Penduduk ( KTP ), Surat Ijin Mengemudi ( SIM ), paspor, kartu golongan darah, tanda pembayaran dan lain sebagainya.

5. Medis, yaitu pemeriksaan fisik secara keseluruhan, yang meliputi bentuk tubuh, tinggi dan berat badan, jenis kelamin, cacat tubuh, atau ciri fisik tertentu, seperti tato, jaringan parut dan sebagainya.
6. Gigi, bentuk gigi dan bentuk rahang merupakan ciri khusus dari seseorang, sedemikian khususnya sehingga dapat dikatakan tidak ada gigi atau rahang yang identik pada dua orang yang berbeda, bahkan pada kembar identik sekalipun.
7. Tulang, yaitu pemeriksaan tulang pada sisa tubuh yang sangat membusuk atau telah membusuk sempurna sehingga tinggal tersisa tulang belulang. Pemeriksaan tulang dapat menentukan jenis kelamin seseorang, perkiraan ras, usia, tinggi badan dan berat badan serta cedera tulang yang dialami orang tersebut.
8. Sidik jari. Tidak ada dua orang yang mempunyai sidik jari yang sama, walaupun kedua orang tersebut kembar identik, sehingga sidik jari mempunyai nilai yang sangat tinggi untuk penentuan identitas seseorang.
9. Serologi, penentuan golongan darah yang diambil baik dari tubuh korban atau pelaku, maupun bercak darah yang terdapat di tempat kejadian perkara.
10. Eksklusi, metode ini pada umumnya hanya dipakai pada kasus di mana banyak terdapat korban (kecelakaan massal), seperti ledakan pesawat, tabrakan kereta api, dan lain-lain.

## 2.1.2. Identifikasi personal modern

Identifikasi personal dengan cara modern ialah dengan menggunakan kode genetik / DNA seseorang. Dasar ilmiah dari pemeriksaan ini ialah bahwa setiap individu, kecuali kembar identik, mempunyai DNA yang berbeda dan unik. Teknik identifikasi personal menggunakan DNA tersebut dikembangkan sejak tahun 1970 sejak ditemukannya enzim restriksi yang dapat memotong DNA menjadi beberapa fragmen pasang basa pada titik yang dikehendaki, fragmen tersebut kemudian diperiksa menggunakan teknik elektroforesis gel. Gambaran pita DNA sampel kemudian dibandingkan dengan *marker* (DNA yang sudah diketahui ukuran pasang basanya) dan *probe* (*template* radioisotop yang telah diketahui urutan basanya).<sup>(3,21,22)</sup>

Pada tahun 1985, Alec Jeffreys dkk dari Universitas Leicester menyebut teknik identifikasi personal tersebut sebagai *DNA fingerprinting*. Istilah *DNA fingerprinting* tersebut digunakan karena DNA setiap individu adalah unik dan khas, sebagaimana sidik jari untuk identifikasi personal. Istilah *DNA typing* atau identifikasi DNA sebenarnya merupakan istilah yang lebih tepat dibandingkan *DNA fingerprinting* atau *DNA profiling*, akan tetapi istilah tersebut sama saja dan penggunaan istilah tersebut bervariasi tergantung pada preferensi seseorang.<sup>(22)</sup>

Terdapat dua teknik forensik berbeda yang digunakan untuk *DNA fingerprinting* :<sup>(1,5,8,19,23,24)</sup>

### 1. Teknik non PCR based

#### a. RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*)

Tehnik pertama yang mengadopsi tehnik analisis DNA forensik adalah RFLP.

Pada tehnik ini DNA secara kimiawi dipotong menjadi beberapa fragmen,



diletakkan pada gel yang mengandung arus listrik sehingga DNA ( yang bermuatan negatif ) akan bergerak ke arah muatan positif berdasar ukuran atau pasang basa DNA. Kemudian DNA ditransfer pada membran nylon dan ditambahkan *probe* DNA radio aktif yang akan terikat pada *sequence* DNA yang sesuai. Sebuah film X-ray diletakkan pada membran. Pada saat film diproses maka akan tampak pola *band* / pita yang disebut sebagai autoradiogram / autorad.

Kekurangan tehnik ini karena harus membutuhkan DNA segar yang relatif banyak dan berkualitas baik. Untuk memproses film X-ray kira-kira membutuhkan waktu satu minggu.<sup>(23,24)</sup>

b. VNTR (*Variable Number Short of Tandem Repeats*)

Metode ini pada dasarnya sama dengan tehnik RFLP. Yaitu melalui tahap ekstraksi DNA, pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi *HaeIII* , *HinfI* atau *HindIII* dan fragmen DNA dipisahkan menggunakan elektroforesis gel.

2. Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) based

PCR merupakan suatu metoda sintesis DNA secara *in vitro*. Prinsipnya sama dengan sintesis DNA secara *in vivo* (kloning), tetapi menggunakan dua buah *primer* yang masing-masing komplementer terhadap kedua untai DNA yang berlawanan. Dengan PCR satu molekul DNA dapat diperbanyak atau digandakan sehingga diperoleh hasil akhir berupa sebuah fragmen DNA dengan ukuran tertentu yang dapat diamati dengan jelas dalam elektroforesis gel agarosa. PCR merupakan metode yang cepat untuk memperbanyak atau menggandakan

satu segmen DNA dan sangat selektif, sehingga tidak diperlukan langkah pemurnian DNA sebelumnya. Hasil penggandaan  $10^6 - 10^8$  kali lebih banyak jika dibandingkan dengan konsentrasi awalnya. <sup>(23,25)</sup>

Teknik PCR sangat sensitif dan dapat menggunakan sampel DNA hingga 1 ng ( 1 nanogram=1/1000.000.000 gram ) untuk kemudian digandakan. Teknik PCR sekarang merupakan teknik yang paling sering digunakan karena dapat digunakan pada sampel yang sangat sedikit hingga 1/100 DNA yang dibutuhkan pada teknik RFLP<sup>(24,25)</sup>

Teknik STR merupakan salah satu teknik PCR-based. STR menggunakan *marker* yang pendek, mengulang pola allele pada segmen mikrovarian antara 3 – 7 pasang basa. <sup>(22)</sup>

### 3. Rapid DNA ID Microchip-Based Genetic Detectors.

Teknik ini menggunakan piranti lunak / perangkat komputer untuk mendeteksi sebuah pola dari tindak kejahatan. Sebenarnya sama dengan perangkat lunak yang digunakan untuk mendeteksi adanya kelainan genetik seseorang, tetapi sudah dimodifikasi dengan pemberian *marker* untuk identifikasi personal. <sup>(22)</sup>

## 2.2 DNA inti

### 2.2.1. Struktur DNA inti

DNA inti merupakan dasar dari informasi genetik setiap individu. DNA adalah komponen yang sangat penting, terkandung dalam setiap sel berinti makhluk hidup. Karakteristik genetik akan diwariskan pada keturunannya. <sup>(3,5,26)</sup>

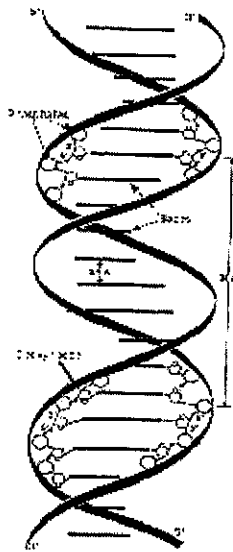
DNA manusia memiliki 46 kromosom, tiap kromosom mengandung kira-kira 550 gen. DNA tersebut terletak di inti sel sehingga disebut sebagai *nuclear* DNA (nDNA).

Selanjutnya nDNA lebih dikenal sebagai DNA saja. Selain genom yang terletak di inti, manusia memiliki DNA lain yang terdapat dalam mitokondria. <sup>(24,26)</sup>

Sejarah perkembangan pengetahuan manusia tentang DNA dimulai pada tahun 1944, saat Oswald Avery mengemukakan DNA sebagai "*the vehicle of generational transference of heritable traits*". Pada tahun 1953, James Watson dan Francis Crick menggambarkan struktur molekul DNA sebagai *double helix*. <sup>(1,24,26)</sup>

Struktur DNA digambarkan sebagai *double-helix* yaitu dua utas rangkaian polinukleotida yang saling membelit satu sama lain. Rangkaian tersebut terdiri atas: deoxyribosa, fosfat, dan pasangan basa. Gugus gula dan fosfat membentuk rangka utas DNA. Setiap gugus gula juga berikatan dengan satu dari 4 basa, yaitu adenin, guanin, cytosin, dan timin. Pada DNA utas ganda, pasangan basa akan mengikat kedua utas. Adenin selalu berpasangan dengan timin, sedangkan guanin selalu berpasangan dengan cytosin. Pada setiap individu, rangka gugus gula dan fosfat adalah sama, namun terdapat variasi pada pasangan basa yang menjadi dasar karakteristik DNA yang berbeda pada masing-masing individu. <sup>(3,26,27)</sup>

Struktur DNA yang *double-helix* dipertahankan oleh adanya ikatan kovalen antara gugus gula dan fosfat, ikatan hidrogen pada pasangan basa, serta ikatan kovalen antara gugus gula dan basa. <sup>(26,27)</sup>



Gambar 2.1. Struktur DNA inti.<sup>(26)</sup>

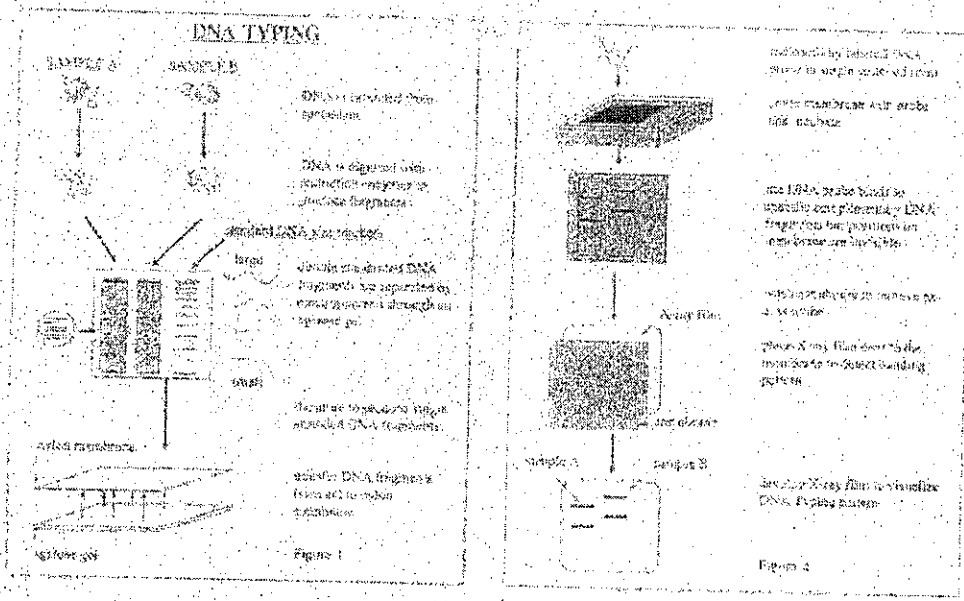
### 2.2.2. DNA inti untuk identifikasi personal

Meskipun gen terdapat pada kromosom di inti sel, hanya sejumlah kecil fraksi DNA yang membentuk gen. Hanya 2,5 – 3,3 % DNA manusia yang mempunyai fungsi. DNA tersebut ialah DNA *coding*, yang berfungsi membentuk enzim dan protein. DNA *coding* tersebut sangat penting untuk analisa genetika klinik, karena mutasi pada DNA *coding* tersebut akan menimbulkan kelainan genetika.<sup>(24)</sup>

Sebagian besar (95%) DNA pada kromosom manusia tidak mempunyai fungsi yang jelas. DNA tersebut adalah DNA *non coding* atau intron, DNA yang tidak mengkode atau tidak membentuk protein. Area DNA *non coding* terdiri dari *sequence* (urutan) pasang basa tandem, yang diturunkan dari kedua orang tua. Urutan tandem tersebut membentuk sidik jari (*fingerprint*) DNA yang unik pada tiap individu - kecuali pada kembar identik-, karena jumlah *repeated* (ulangan) *sequence* bervariasi pada tiap

individu. Urutan pasang basa DNA *non-coding* tersebut disebut sebagai *Variable Number Tandem Repeats (VNTR)*.<sup>(24)</sup>

Untuk keperluan di bidang forensik, maka analisa DNA menggunakan metode RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*) yang terdiri beberapa tahap.<sup>(24)</sup>

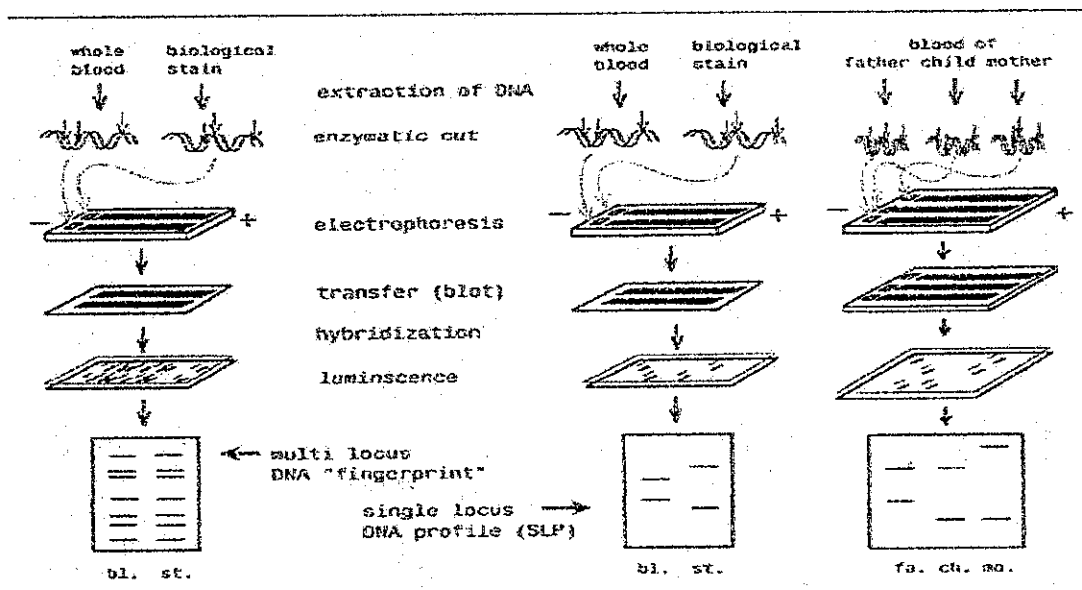


Gambar 2.2. Skema metode RFLP. Mula-mula DNA dipotong menjadi beberapa fragmen. Pemotongan DNA tersebut menggunakan enzim, yaitu enzim restriksi (*RE – Restriction enzyme*), enzim nuklease restriksi atau endonuklease restriksi. Panjang fragmen DNA yang terpotong pada tiap individu akan berbeda karena lokasi / *sites* pemotongan enzim pada tiap individu akan berbeda. Fragmen DNA tersebut kemudian dipisahkan satu sama lain dengan proses elektroforesis pada gel agarose, sehingga tampak gambaran *band / pita-pita* DNA yang terpisah berdasar ukurannya. Pita tersebut akan tampak jelas di bawah lampu ultra violet. DNA yang telah terpisah tersebut kemudian ditransfer ke atas membran nitroselulosa melalui proses Southern Blot. Membran yang telah ditemplei DNA kemudian dilekatkan pada *probe* DNA yang ditemplei radioisotop melalui proses hibridisasi. Setelah dilakukan pencucian, pita DNA dapat dilihat dengan proses autoradiografi.<sup>(24)</sup>

Teknologi DNA *typing* standar yang digunakan semula ialah RFLP. Sejak tahun 1997 laboratorium forensik di Kanada dan Eropa telah menggunakan metode identifikasi

forensik *Short Tandem Repeat* (STR) atau analisis genom. Teknik STR ditetapkan menjadi pilihan pertama untuk analisis bercak dan investigasi kriminal di Eropa. Teknik STR menggunakan beberapa loci. Loci STR yang paling terkenal ialah HUMTH01. (24,28,29,30)

Berdasar penugasaan European DNA profiling Group (EDNAP) dan rekomendasi European Network of Forensic Science Institute (ENSFI) pada pertemuan kerja Interpol, terdapat empat standar loci STR : HUMTH01, HUMVWFA31, D21S11 dan HUMFIBRA/FGA. Baru-baru ini ditambahkan juga loci D3S1358, D8S117 dan D18S51. Terdapat dua tipe plat yang digunakan untuk analisis teknik STR (yang juga digunakan untuk teknik mtDNA) yaitu *flat bed gels* dan *capillary gel electrophoresis* (CE). (31,32)



Gambar 2.3. Skema prosedur DNA typing. (28)

Kiri : Penggunaan *probe* berkekuatan rendah menghasilkan pola multilokus. Tampak kecocokan antara darah (sampel referensi) dan bercak pada tempat kejadian perkara. Tengah : *Probe* sangat sensitif mendeteksi alel hanya pada 1 locus. Tampak tak ada kecocokan antara referensi dan bercak. Kanan : Kasus keayahan. Tampak profile anak memperlihatkan satu alel dari ibu dan satu alel dari dari tersangka ayah – sehingga tersangka tersebut adalah ayah biologis dari anak tersebut.

## 2.3 DNA mitokondrial

### 2.3.1 Struktur DNA mitokondrial

Selain genom yang terletak di inti, manusia memiliki DNA lain yang terdapat dalam sitoplasma yaitu terletak di dalam mitokondria. Jumlah DNA mitokondrial (mtDNA) biasanya kurang dari 0,1% dari semua DNA sel yang terdapat di dalam organel mitokondria. mtDNA merupakan molekul yang amat kecil dibandingkan dengan kromosom inti. Mitokondria memiliki sistem genetik yang berbeda dengan sistem genetik inti dan terdapat pada bagian matrik mitokondria. Setiap mitokondria memiliki dua sampai enam *copy* mtDNA. <sup>(33,34,35)</sup>

DNA mitokondrial (mtDNA) merupakan DNA beruntai ganda berbentuk lingkaran tertutup yang telah diketahui urutan nukleotidanya secara lengkap. MtDNA yang berukuran 16.569 pb ( pasang basa ), padat gen dan hampir tidak mempunyai intron mengandung 37 gen yang menyandi 13 polipeptida yang menyusun protein kompleks rantai respirasi, 22 tRNA dan 2 rRNA yang diperlukan untuk proses sintesis protein mitokondria. Di samping itu terdapat pula suatu daerah kontrol yang tidak menyandi protein ( *non coding region* ) yang disebut sebagai *displacement loop* ( D-loop ) sepanjang 1122 pb. *D-loop* merupakan daerah kontrol utama ekspresi mtDNA, selain berfungsi sebagai *leading strand replication* serta promotor utama untuk transkripsi. <sup>(17,33,34)</sup>

mtDNA terdiri atas 2 untai molekul yang saling berbentuk heliks yaitu untai H (*Heavy*), kaya akan nukleotida G dan untai L (*Light*), kaya akan nukleotida C. Komposisi nukleotida untai L adalah 24,7% T, 30,9% A ( 55,6% AT) dan 31,2% C, 13,1% G (44,3% GC). <sup>(34)</sup>





disebabkan MtDNA memiliki mekanisme respirasi yang terbatas, tidak mempunyai protein histon sebagai pelindung dan memiliki kandungan radikal bebas yang tinggi<sup>(35)</sup>

Perbedaan sifat antara nDNA dan mtDNA dapat dilihat pada tabel 1.<sup>(33)</sup>

Tabel 2.1. Perbedaan nDNA dan mtDNA manusia

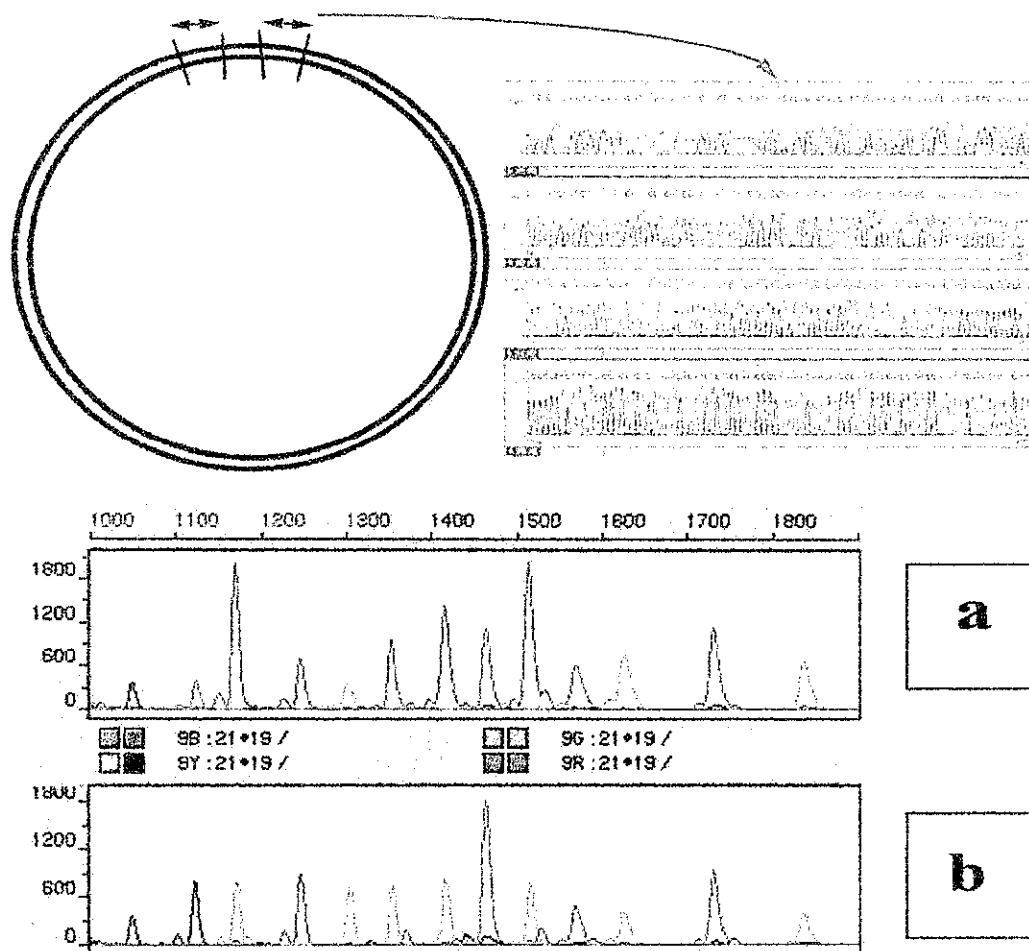
Karakteristik	DNA inti	DNA mitokondrial
Ukuran	3 milyar pb	16.569 pb
Copy / sel	2	Bisa > 1000
Struktur	Linier, dikemas dalam kromosom	Sirkuler
Penurunan	Paternal dan maternal	Maternal
Rekombinasi	Ya	Tidak
Laju mutasi	Rendah	5 – 10 kali inti
Sekuens	Human Genome Project (2002)	Anderson et al (1981)

### 2.3.2 DNA mitokondrial untuk identifikasi personal

Salah satu keunikan mtDNA - yaitu memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi, sehingga dapat digunakan untuk mengetahui hubungan antar individu atau hubungan maternal.<sup>(33,38)</sup>

Pada daerah *D-loop* terdapat dua daerah hipervariabel, HVR I (15997 – 16401 nt) dan HVR II (029 – 409 nt) dimana derajat keragaman daerah tersebut antar individu yang tidak memiliki hubungan kekerabatan cukup tinggi. Oleh karenanya, dalam penentuan identitas seseorang dapat hanya menggunakan daerah *D-loop* saja. Apabila tidak terdapat mutasi baru pada mtDNA maka urutan mtDNA individu-individu yang mempunyai hubungan keluarga secara maternal, seperti saudara kandung laki-laki dan perempuan atau ibu dan anak perempuan akan tepat sama. Hal ini sangat mempermudah dalam penyelidikan kasus-kasus orang hilang. Pada kedokteran forensik untuk mengetahui

adanya variasi basa atau polimorfisme pada mtDNA biasanya dilakukan terlebih dulu penggandaan DNA dengan menggunakan tehnik PCR. Untuk daerah *D-loop*, pendekatan yang dilakukan adalah dengan melipatgandakan satu fragmen DNA, bisa daerah HVRI maupun pada HVRII . (3,33,36)



Gambar 2.5. Tampilan skematik molekul mtDNA yang memperlihatkan 400 *sequence* basa dari regio kontrol (*D-loop*) serta contoh tes *minisequencing* dari mtDNA mukosa buccal (a) dan feses (b). Profil berbeda, sehingga tersangka dapat dieklusi. (32)

Penelitian-penelitian untuk mengidentifikasi korban perang, sampel yang sangat sedikit, sampel lama dan mengalami degradasi cenderung menggunakan analisis mtDNA

daripada nDNA. Hal ini disebabkan di dalam satu sel terdapat ratusan hingga ribuan mitokondria dan masing-masing mitokondria mempunyai beberapa *copy* mtDNA, sehingga setiap sel dapat mempunyai 1000 hingga 10.000 *copy* mtDNA. Sedangkan dalam satu sel hanya terdapat sebuah inti sel yang mengandung 2 set kromosom, yaitu satu set paternal dan satu set maternal, yang mana masing-masing terdiri dari 23 kromosom. Walaupun nDNA memiliki jumlah basa yang lebih banyak daripada mtDNA, tetapi dalam mtDNA terdapat jumlah *copy* yang jauh lebih banyak daripada nDNA. Oleh karenanya karakteristik mtDNA ini berguna bagi sampel dengan jumlah DNA yang sangat sedikit, seperti sampel-sampel yang diambil dari kasus kriminalitas yaitu rambut, tulang, gigi, dan cairan tubuh (air liur, air mani, bercak darah, urin).<sup>(33,39,40,41)</sup>

Laboratorium *Federal Bureau of Investigation* (FBI) Amerika telah melakukan analisis mtDNA sebagai alat penentuan identitas manusia sejak akhir tahun 1980. Pada tahun 1992, laboratorium penelitian ini juga telah menggunakan sekuensing mtDNA bagi kasus-kasus forensik. Setelah itu, pada bulan Juni 1996 telah mulai dilakukan pengujian terhadap sampel-sampel yang merupakan barang bukti suatu tindak kejahatan.<sup>(18,42)</sup>

Laboratorium Identifikasi DNA Angkatan Bersenjata Amerika (*The Armed Force DNA Identification Laboratory, AFDIL*) telah menggunakan analisis mtDNA untuk identifikasi manusia dari konflik militer di Asia Tenggara, Korea, dan Perang Dunia II [Wadhams, 1989]. Analisis mtDNA berhasil mengidentifikasi kerangka serdadu Amerika yang meninggal pada perang Vietnam (yang terkubur  $\pm$  24 tahun sebelum tes identifikasi), sedangkan analisis nDNA dan PCR mengalami kegagalan.<sup>(37)</sup>

## 2.4 Urin untuk identifikasi personal

Pemeriksaan urin untuk identifikasi personal terutama diaplikasikan pada kasus penolakan hasil pemeriksaan urin (*screening* narkoba, doping). Donor urin yang terbukti positif seringkali menolak hasil pemeriksaan tersebut dan menyatakan bahwa terjadi kesalahan / penukaran sampel urin dan sampel urin yang diperiksa tersebut bukan urin yang dikemihkan olehnya. Pada kasus- kasus tersebut dilakukan identifikasi personal dengan membandingkan kecocokan profil DNA urin dengan sampel referensi dari donor tersebut (sampel darah).<sup>(10,13,42,43)</sup>

### 2.4.1 Fisiologi dan macam sampel urin

DNA urin berasal dari sel-sel yang dieksresikan lewat ginjal dan saluran kemih. Sel tersebut ialah sel darah putih, sel epitel dan silinder (*cast*) sel darah putih atau silinder epitel. Sel darah putih pada sedimen urin antara lain netrofil, eosinofil, limfosit, monosit dan makrofag. Sel netrofil merupakan sel darah putih yang paling sering dijumpai pada urin. Secara normal, terdapat 5 – 30 neutrofil /  $\mu\text{l}$  urin. Urin hipotonik menyebabkan sel lekosit membengkak, berbentuk sferis dan lisis. Pada suhu ruang 50 % lekosit akan mengalami lisis dalam jangka waktu 2-3 jam sejak dikemihkan. Sejumlah kecil sel epitel terdapat pada sedimen urin normal dan menggambarkan pelepasan sel –sel tua. Sel epitel squamous merupakan sel epitel yang paling sering dan paling besar yang dijumpai pada urin. Sel squamous pada wanita berasal dari saluran uretra sedangkan pada pria berasal dari bagian distal uretra. Sel epitel transisional berasal dari kaliks renal, pelvis renalis, ureter dan kandung kencing, dan bagian proksimal uretra pada pria. Sel epitel renal berasal dari tubulus renalis.<sup>(44,45)</sup>

Urin sewaktu dan pancaran rutin merupakan sampel urin yang paling sering digunakan pada *screening*, terutama untuk obat-obatan / narkoba, karena merupakan jenis sampel yang paling mudah, nyaman, dapat diambil sewaktu-waktu dan tanpa persiapan tertentu. Sampel urin terbaik untuk pemeriksaan ialah urin segar, yaitu urin harus diperiksa 3 – 6 jam setelah dikemihkan. Apabila pemeriksaan ditunda, maka urin harus diawetkan. Bahan pengawet urin untuk pemeriksaan DNA ialah sodium azide. Penambahan sodium azide akan memperpanjang waktu simpan pada suhu ruang. Cara pengawetan urin yang paling mudah, paling sering digunakan dan dapat digunakan pada semua jenis pemeriksaan urin (termasuk tes narkoba) ialah dengan menyimpan urin pada suhu 4 – 6° C (disimpan pada lemari es). Penyimpanan pada suhu 4 – 6° C tersebut akan mencegah proliferasi bakteri dan sampel urin masih dapat digunakan untuk kultur tanpa kontaminasi bakteri hingga 24 jam setelah urin dikemihkan. <sup>(11)</sup>

#### 2.4.2 Pemeriksaan DNA inti pada urin

Sampel urin sangat jarang digunakan untuk pemeriksaan DNA inti. Hal itu disebabkan jumlah sel berinti pada sampel urin sangat sedikit. Jumlah DNA yang dapat diekstraksi dari sampel urin bervariasi antara 0 – 800 ng / 20 ml urin segar. Benecke (2001) menyatakan bahwa jumlah DNA maksimal yang dapat diekstraksi dari 50 ml urin yang telah tersimpan semalam pada suhu 4°C ialah 232 ng. Oleh karena jumlah sel berinti tersebut sangat sedikit, maka pemeriksaan DNA urin menggunakan teknik PCR yang dapat menggandakan DNA hasil ekstraksi dari sampel urin hingga ribuan kali, sehingga dapat memperlihatkan gambaran *band* / pita DNA secara jelas pada elektroforesis gel. Penelitian Linfert (1998), menyatakan bahwa tingkat keberhasilan DNA *typing* dari sampel urin yang dibekukan (*frozen*), yang tercemar kontaminan (*E. coli*, albumin serum,

glukosa, detergent dan pemutih) maupun tidak ialah 71 %. Penelitian Benecke (2001) menyatakan keberhasilan DNA *typing* dari sampel urin simpan semalam pada suhu 4°C tersebut ialah 8 dari 11 sampel yang diperiksa. <sup>(14)</sup>

Oleh karena jumlah sel epitel pada urin sangat sedikit, Benecke menggunakan 3 loci STR pendek (*multiplex system*), kurang dari 300 pb, yaitu CD4, DHFRP/HUMFOLP23 dan D8S306. CD4 ialah locus identifikasi manusia yang terkenal sedangkan locus DHFRP/HUMFOLP23 ditemukan oleh Kimpton et al dan Benecke et al pada tahun 1993. <sup>(14,15)</sup>

#### 2.4.3 Pemeriksaan DNA mitokondrial pada urin

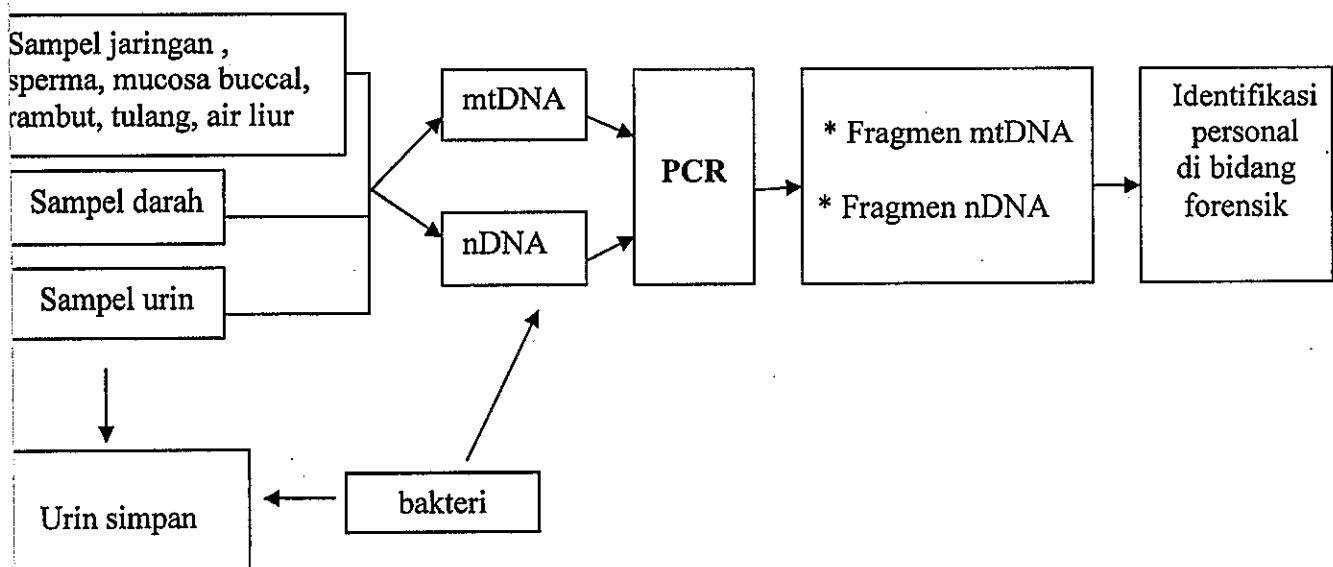
Pemeriksaan mtDNA urin pada urin merupakan pemeriksaan terpilih karena jumlah sel yang terdapat dalam urin sangat sedikit, sehingga DNA yang diekstraksipun sangat minimal. <sup>(10,46,47)</sup>

Junge dkk (2003) menemukan pada kasus penolakan atlit atas kecurigaan doping nandrolon, mtDNA dari urin yang telah tersimpan selama 9 bulan pada suhu -20°C ternyata dapat diidentifikasi dan cocok dengan mtDNA darah atlit tersebut. *Marker* DNA yang digunakan pada elektroforesis gel menggunakan fragmen DNA dengan pasang basa kecil, yaitu 70 – 200 bp, karena DNA pada sampel urin, terutama urin simpan, pada umumnya telah mengalami fragmentasi. Pemeriksaan DNA urin pada kasus tersebut mengalami kegagalan. Pemeriksaan mtDNA urin menggunakan *primer* area *D-loop* pada mtDNA, yaitu pada area HVR I dan HVR II <sup>(10,13,15,48)</sup>

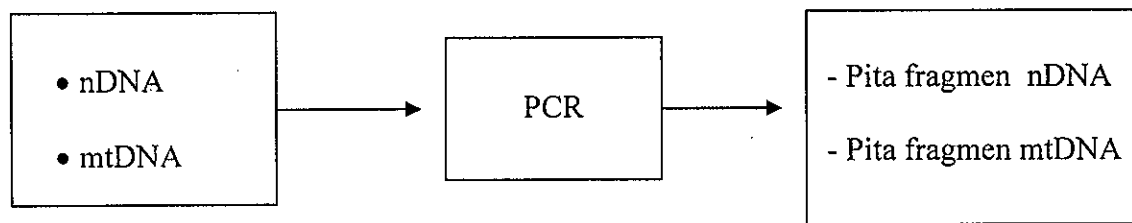
## BAB 3

### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

#### 3.1 Kerangka teori



### 3.2 Kerangka konseptual



### 3.3 Hipotesis

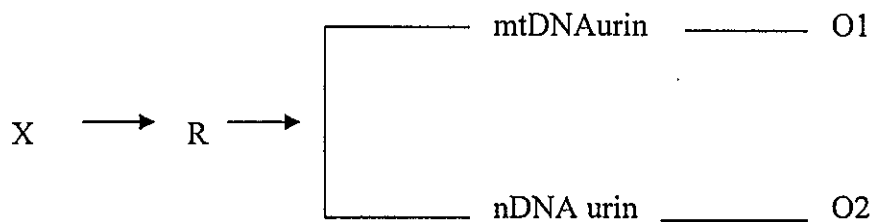
Terdapat perbedaan hasil preparasi fragmen mtDNA dibanding preparasi fragmen nDNA pada sampel urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal



**BAB 4**  
**METODE PENELITIAN**

**4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian cross sectional analitik.



**4.2 Populasi dan sampel**

**4.2.1. Populasi**

Populasi penelitian adalah subyek yang datang untuk melakukan tes urin di bagian Forensik Fakultas Kedokteran UNDIP

**4.2.2. Sampel**

**4.2.2.1. Besar sampel**

Besar sampel dihitung berdasarkan perhitungan besar sampel untuk 2 mean, dengan rumus :

$$n_1 = n_2 = 2 \left[ \frac{(Z\alpha + Z\beta)S}{(X_1 - X_2)} \right]^2$$

Dimana :

$n_1 = n_2$  = jumlah sampel pada tiap kelompok

S = simpang baku

$X_1 - X_2$  = perbedaan klinis yang diinginkan

$\alpha$  = tingkat kemaknaan

$\beta$  = power penelitian

Bila diterima tingkat kemaknaan ( $\alpha$ ) = 0,05 dan kemungkinan mendeteksi perbedaan (power) sebesar 80%, simpang baku 15, dan perbedaan klinis yang diinginkan sebesar 20, maka :

$$n = 2 \left[ \frac{(1,96 + 1,282) \times 15}{20} \right]^2$$

$$n = 12$$

Sehingga jumlah sampel minimal untuk masing-masing kelompok ialah 12 ( $\pm 10\%$ )

#### 4.2.2.2. Kriteria sampel

Kriteria inklusi :

- \* Subyek bersedia berpartisipasi dalam penelitian
- \* Sampel dikemihkan di Laboratorium Forensik FK UNDIP - RSDK
- \* Sampel dari semua golongan umur dan jenis kelamin

Kriteria eksklusi :

- \* Terdapat bakteri urin pada pemeriksaan mikroskopis.
- \* Terdapat sperma pada urin dari sampel perempuan.

#### 4.2.2.3. Cara pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *systematic sampling*. Pada tehnik ini ditentukan bahwa tiap subyek yang memeriksakan urin di laboratorium forensik FK UNDIP tiap nomor kelipatan 3 dimasukkan sebagai sampel hingga jumlah sampel mencukupi.

### **4.3. Variabel Penelitian dan definisi**

#### **4.3.1. Variabel Penelitian**

##### **4.3.1.1 Variabel bebas**

Variabel bebas adalah jenis DNA : nDNA dan mtDNA

Skala data : skala nominal

##### **4.3.1.2. Variabel tergantung**

Variabel tergantung adalah gambaran pita fragmen DNA : nDNA dan mtDNA

Unit pengukuran :

Gambaran pita / *band* fragmen DNA : positif (+) / negatif (-)

Skala data : nominal

##### **4.3.1.3. Variabel perantara**

Variabel perantara adalah metode pemeriksaan : PCR

#### **4.3.2. Definisi operasional**

- Sampel urin simpan adalah sampel urin yang dikemihkan oleh subyek penelitian di laboratorium Forensik FK UNDIP (urin sewaktu), disimpan selama 24 jam sejak dikemihkan, pada suhu 4° C
- Hasil preparasi fragmen nDNA adalah gambaran visual pita / *band* nDNA pada gel elektroforesis menggunakan ekstrak DNA yang telah di PCR menggunakan *primer* nDNA untuk identifikasi personal. Didokumentasikan pada kamera dengan filter Ultra Violet.

Hasil positif ialah apabila terbentuk gambaran pita / *band* pada gel. Sedangkan hasil negatif ialah apabila tidak terbentuk gambaran pita / *band*.

- Hasil preparasi fragmen mtDNA adalah gambaran visual pita / *band* mtDNA pada gel elektroforesis menggunakan ekstrak DNA yang telah di PCR menggunakan *primer* mtDNA untuk identifikasi personal. Didokumentasikan pada kamera dengan filter Ultra Violet.

Hasil positif ialah apabila terbentuk gambaran pita / *band* pada gel. Sedangkan hasil negatif ialah apabila tidak terbentuk gambaran pita / *band*.

#### 4.4 Bahan dan Alat penelitian

##### 4.4.1 Bahan penelitian

- Urin simpan
- *Primer* nDNA untuk identifikasi personal:  
5'-XGTAAGACTTTTGGAGCCATT  
5'- TTC AGG GAG AAT GAG ATG GG
- *Primer* mtDNA untuk identifikasi personal:  
L15904 : 5'-CTAATACACCAGTCTTGTAACCGGAG-3'  
H16540: 5'-GTGGGCTATTTAGGCTTTATGACCCTG-3'

##### 4.4.2. Alat / instrumen penelitian

- ï Alat pengambilan sampel urin : *falcon tube* 50 ml.
- ï Alat pengambilan darah vena : *disposable spuit* 3 ml, manset, tabung EDTA
- ï Refrigerator Toshiba
- ï Sterilisator : Autoclave, Electric Pressure steam sterilizer model no. 25X (American) ; Laminar flow (Labconco Co, Kansas City)
- ï Inkubator CO2 MCO – 175 ( Sanyo, Japan )
- ï Centrifuge model 5804 R (Eppendorf, Germany)

- ï Microcentrifuge model 5417R (Eppendorf, Germany)
- ï Spectrofotometer model UV mini – 1240 ( Shimadzu, Japan )
- ï Mesin PCR system 2400 Gene Amp (Perkin Elmer)
- ï Alat elektroforesi gel model EC250-90E-C (Apparatus Corporation)
- ï Lampu dan kamera UV model No. GDS8000+ TFM 20 (merk UVP)

#### 4.5 Prosedur pengumpulan data

1. Subyek yang melakukan pemeriksaan urin di laboratorium Forensik FK UNDIP yang bersedia berpartisipasi dalam penelitian diminta menandatangani blanko kesediaan.
2. Semua prosedur (alat dan pemeriksa) dilakukan pada keadaan steril.
3. Responden yang terpilih dilakukan pengambilan urin. Urin ditampung dalam *falcon tube* 50 ml dan disimpan 24 jam pada suhu 4°C. Setelah 24 jam, diambil kira-kira 10 ml urin dimasukkan dalam tabung steril, disentrifuge dengan kecepatan 1500-2000 rpm. Sedimen yang terbentuk diperiksa di bawah mikroskop untuk pemeriksaan bakteri urin. Apabila terdapat bakteri, maka sampel tidak digunakan untuk penelitian.
4. Darah vena digunakan sebagai sampel referensi. Tiga cc darah vena ditampung pada tabung EDTA steril.
5. Isolasi DNA darah dan urin simpan. Prosedur isolasi DNA darah menggunakan metode *salting out*. Prosedur isolasi DNA urin menggunakan prosedur dari Noer AS. <sup>(17)</sup>

6. Hasil isolasi / ekstraksi DNA darah dan urin simpan masing-masing dibagi dua, sebagian untuk preparasi fragmen nDNA, sebagian untuk preparasi fragmen mtDNA untuk kepentingan identifikasi personal
7. Preparasi fragmen nDNA urin simpan dan darah
  - Ekstrak DNA urin simpan diproses PCR menggunakan *primer* nDNA untuk identifikasi personal sehingga didapatkan fragmen nDNA urin simpan untuk identifikasi personal. Ekstrak DNA darah diproses PCR menggunakan *primer* nDNA untuk identifikasi personal sehingga didapatkan fragmen nDNA darah untuk identifikasi personal.
  - Fragmen nDNA urin simpan untuk identifikasi personal diproses di elektroforesis gel bersama / bersisian dengan fragmen nDNA darah sampel referensi
  - Gambaran pita / *band* fragmen nDNA urin simpan dan darah (sampel referensi) didokumentasikan menggunakan kamera UV
  - Dilakukan dokumentasi keberhasilan pembentukan pita / *band* fragmen nDNA urin simpan dibandingkan sampel referensi.
8. Preparasi fragmen mtDNA urin simpan dan darah
  - Ekstrak DNA urin simpan diproses PCR menggunakan *primer* mtDNA untuk identifikasi personal sehingga didapatkan fragmen mtDNA urin untuk identifikasi personal. Ekstrak DNA darah diproses PCR menggunakan *primer* mtDNA untuk identifikasi personal sehingga didapatkan fragmen mtDNA urin untuk identifikasi personal.

- Fragmen mtDNA urin simpan untuk identifikasi personal diproses elektroforesis gel bersama / bersisian dengan fragmen mtDNA darah sebagai sampel referensi
  - Gambaran pita / *band* fragmen mtDNA urin simpan dan darah (sampel referensi) didokumentasikan menggunakan kamera UV
  - Dilakukan dokumentasi keberhasilan pembentukan pita / *band* fragmen mtDNA urin simpan dibandingkan sampel referensi. Data dicatat dan ditabulasi.
9. Dilakukan perbandingan data keberhasilan pembentukan pita / *band* fragmen nDNA dan mtDNA urin simpan. Data dicatat dan ditabulasi.

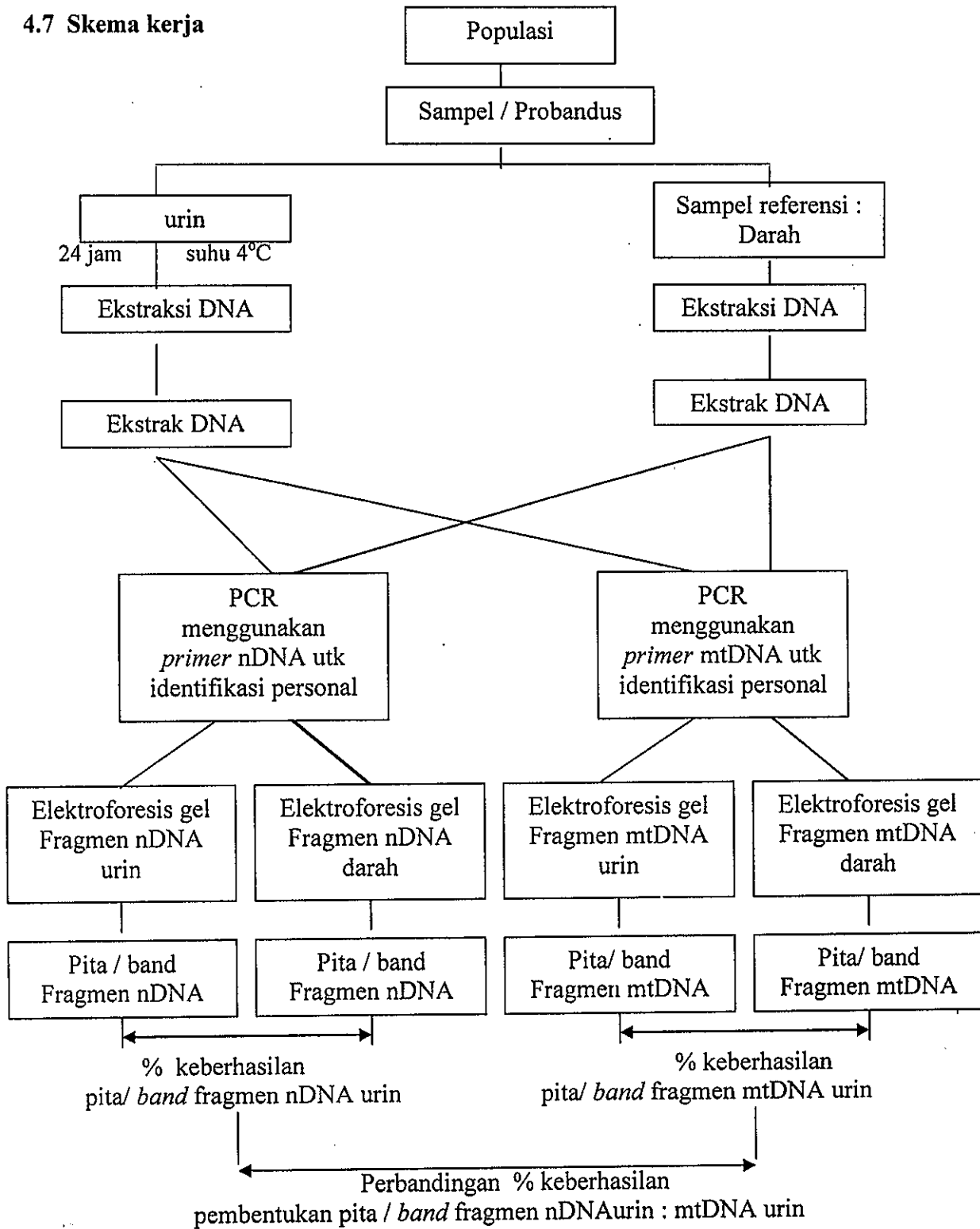
#### **4.6 Lokasi penelitian**

##### **4.6.1 Lokasi penelitian**

Penelitian dilakukan di bagian Forensik FK UNDIP Semarang dan laboratorium PAU UGM Yogyakarta.

Lama Penelitian 8 bulan.

4.7 Skema kerja





#### 4.4 Analisis data

Pengolahan dan analisis data secara univariat dan bivariat dilakukan dengan bantuan komputer yaitu dengan menggunakan program SPSS for Windows versi 10.0.

Data yang sudah terolah kemudian dianalisis secara diskriptif dan analitik sesuai dengan tujuan penelitian :

1. Data yang berupa hasil pemeriksaan DNA ( nDNA dan mtDNA ) dari sampel urin dan darah dimasukkan ke dalam file komputer. Setelah dilakukan *cleaning* maka dibuat analisis diskriptif dengan membuat :

- Diskripsi ada tidaknya pembentukan pita ( *band* ) antara sampel urin dan darah pada pemeriksaan fragmen nDNA
- Diskripsi ada tidaknya pembentukan pita ( *band* ) antara sampel urin dan darah pada pemeriksaan fragmen mtDNA
- Diskripsi kesesuaian pembentukan pita ( *band* ) antara fragmen mtDNA dibanding nDNA pada sampel urin.

2. Untuk melihat kesesuaian pembentukan pita ( *band* ) antara sampel urin dan darah ( nDNA dan mtDNA ) maka dilakukan analisis uji kappa untuk melihat reliabilitasnya, disajikan dalam bentuk tabel silang 2 X 2. Untuk melihat perbedaan pembentukan pita ( *band* ) antara mtDNA urin dengan nDNA urin dilakukan dengan uji Mc. Nemar

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

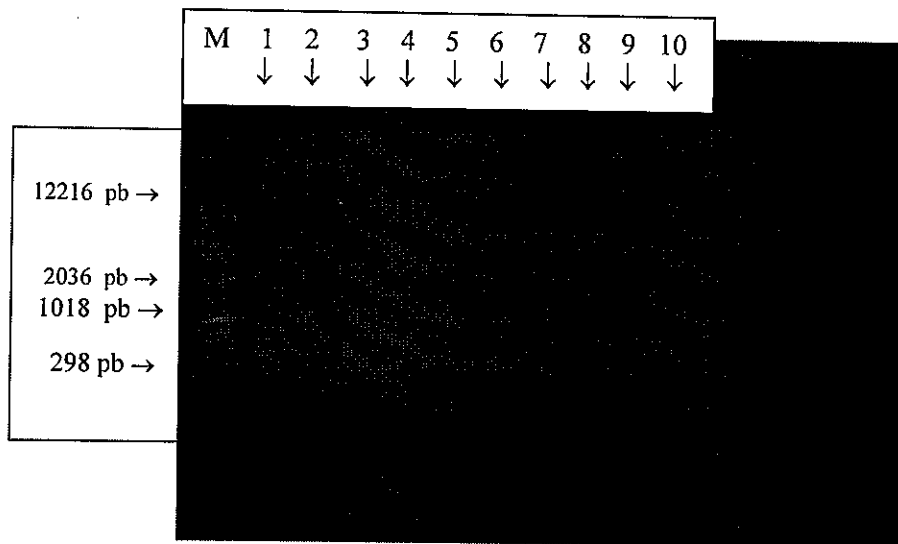
Jumlah orang yang melakukan pemeriksaan urin di laboratorium forensik FK UNDIP selama periode bulan Mei 2004 – Juli 2004 ialah 42 orang. Dari jumlah tersebut diperoleh responden 12 orang yang bersedia ikut dalam penelitian dan memenuhi kriteria inklusi. Responden terdiri dari 5 orang laki-laki dan 7 orang perempuan. Dari 12 responden tidak ada yang dieksklusi karena tidak dijumpai bakteri pada urin simpan maupun adanya sperma pada urin responden perempuan.

#### 5. 1. Data dasar

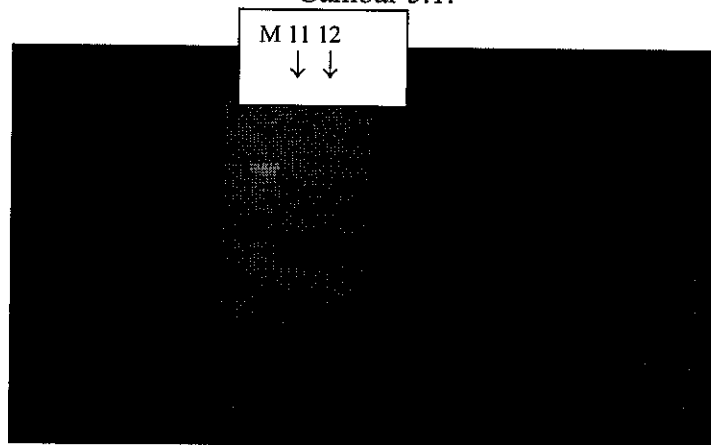
Tabel 5.1. Data dasar penelitian

No.sampel	Jenis kelamin	nDNA Darah	nDNA Urin	MtDNA Darah	MtDNA Urin
1.	Laki-laki	+	+	+	+
2.	Perempuan	+	-	+	+
3.	Perempuan	+	+	+	+
4.	Laki-laki	+	-	+	-
5.	Perempuan	+	-	+	+
6.	Laki-laki	+	-	+	+
7.	Perempuan	+	+	+	+
8.	Perempuan	+	-	+	+
9.	Laki-laki	+	-	+	+
10.	Perempuan	+	-	+	-
11.	Laki-laki	+	-	+	+
12.	Perempuan	+	+	+	+

Setelah dilakukan ekstraksi DNA dan PCR menggunakan primer standar untuk identifikasi personal, maka didapatkan hasil gambaran pita / *band* dari elektroforesis gel sebagaimana tampak pada gambar 5.1 – 8



Gambar 5.1.



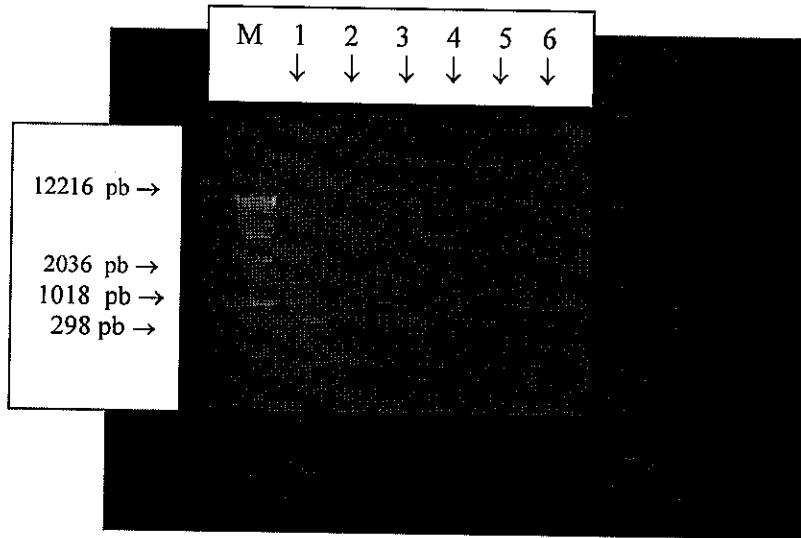
Gambar 5.2.

Gambar 5.1. dan 5.2.

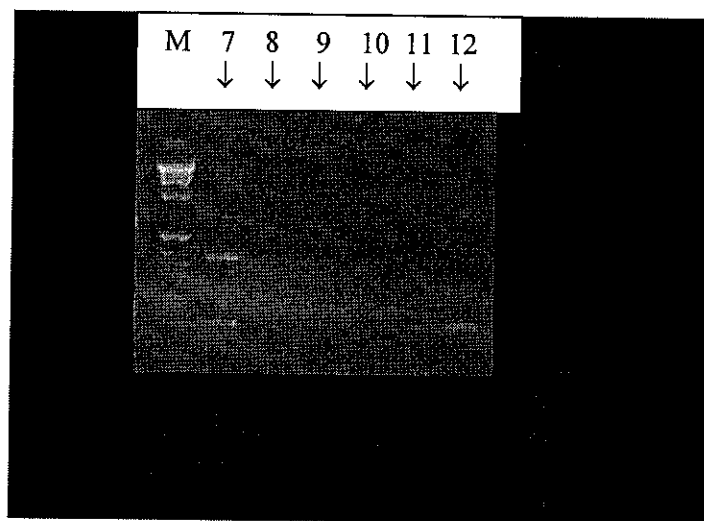
Hasil preparasi fragmen nDNA darah untuk kepentingan identifikasi personal setelah elektroforesis pada gel agarose 2% dan didokumentasikan dengan kamera UV.

Dari kiri ke kanan : M ialah *marker* DNA dengan panjang basa 220 - 12216 pb

Kolom nomor 1 – 12 adalah sampel DNA responden 1 – 12. Tampak pembentukan pita / *band* pada 12 kolom gel sampel tersebut dengan panjang basa  $\pm 300$  pb



Gambar 5.3.



Gambar 5.4.

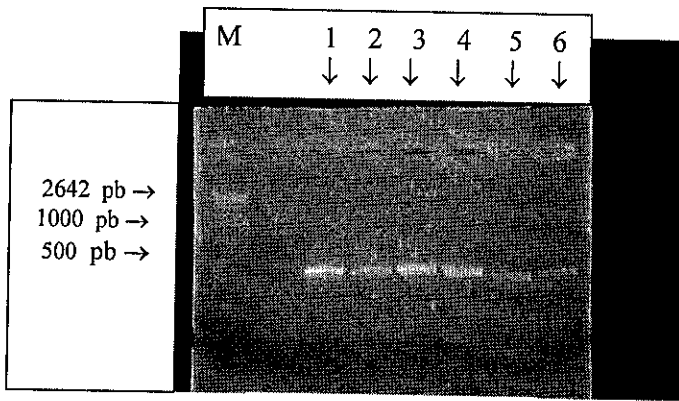
Gambar 5.3. dan 5.4.

Hasil preparasi fragmen nDNA urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal setelah elektroforesis pada gel agarose 2% dan didokumentasikan dengan kamera UV.

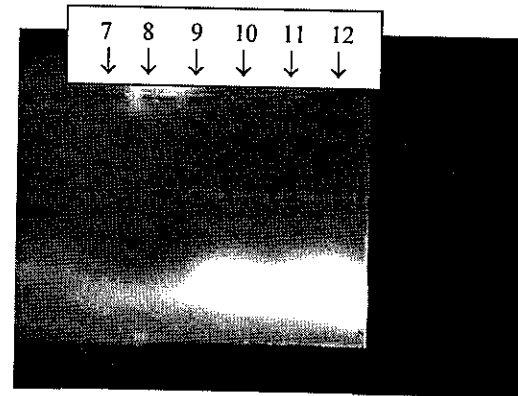
Dari kiri ke kanan : M ialah marker DNA dengan panjang basa 220 - 12216 pb

Kolom nomor 1 – 12 adalah sampel DNA responden 1 – 12.

Tampak pembentukan pita / *band* pada kolom gel sampel 1,3, 7 dan 12 dengan panjang basa  $\pm 300$  pb



Gambar 5.5

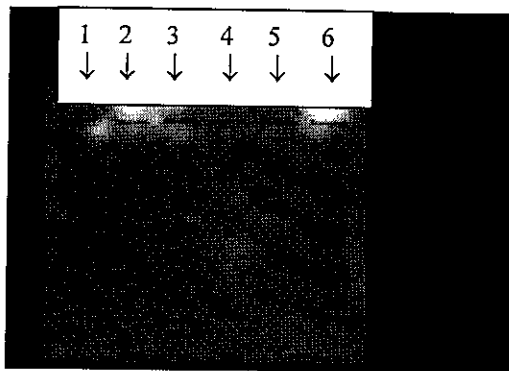


Gambar 5.6

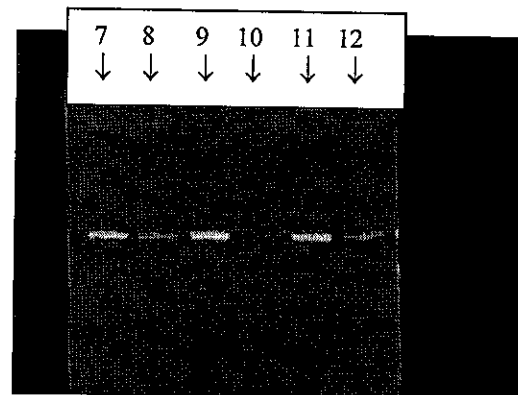
Gambar 5.5. dan 5.6.

Hasil preparasi fragmen mtDNA darah untuk kepentingan identifikasi personal setelah elektroforesis pada gel agarose 2 % dan didokumentasikan dengan kamera UV.

Dari kiri ke kanan : kolom 1 dan 2 ialah M (marker) DNA dengan panjang basa 100 - 2642 pb Kolom 3 – 14 (nomor 1 – 12) adalah sampel DNA responden 1 – 12. Tampak pembentukan pita / *band* pada 12 kolom gel sampel tersebut dengan panjang basa  $\pm 400$  pb.



Gambar 5.7



Gambar 5.8

Gambar 5.7. dan 5.8.

Hasil preparasi fragmen mtDNA urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal setelah elektroforesis pada gel agarose 2 % dan didokumentasikan dengan kamera UV.

Dari kiri ke kanan : Kolom 1 – 12 (nomor 1 – 12) adalah sampel DNA responden 1 – 12. Tidak tampak pembentukan pita / *band* pada kolom gel sampel ke 4 dan 10.

Gambaran pita / *band* hasil preparasi fragmen mtDNA darah maupun mtDNA urin simpan menampakkan densitas yang lebih tinggi dibanding pita / *band* nDNA darah maupun nDNA urin simpan.

## 5. 2. Analisis Univariat

Hasil analisis univariat disajikan dalam tabel distribusi frekuensi.

### 5.2.1. Hasil preparasi fragmen nDNA sampel darah dan urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal

Hasil preparasi fragmen nDNA sampel darah dan urin simpan dinyatakan sebagai positif (bila terbentuk pita / *band*) atau negatif (bila tidak terbentuk pita / *band*).

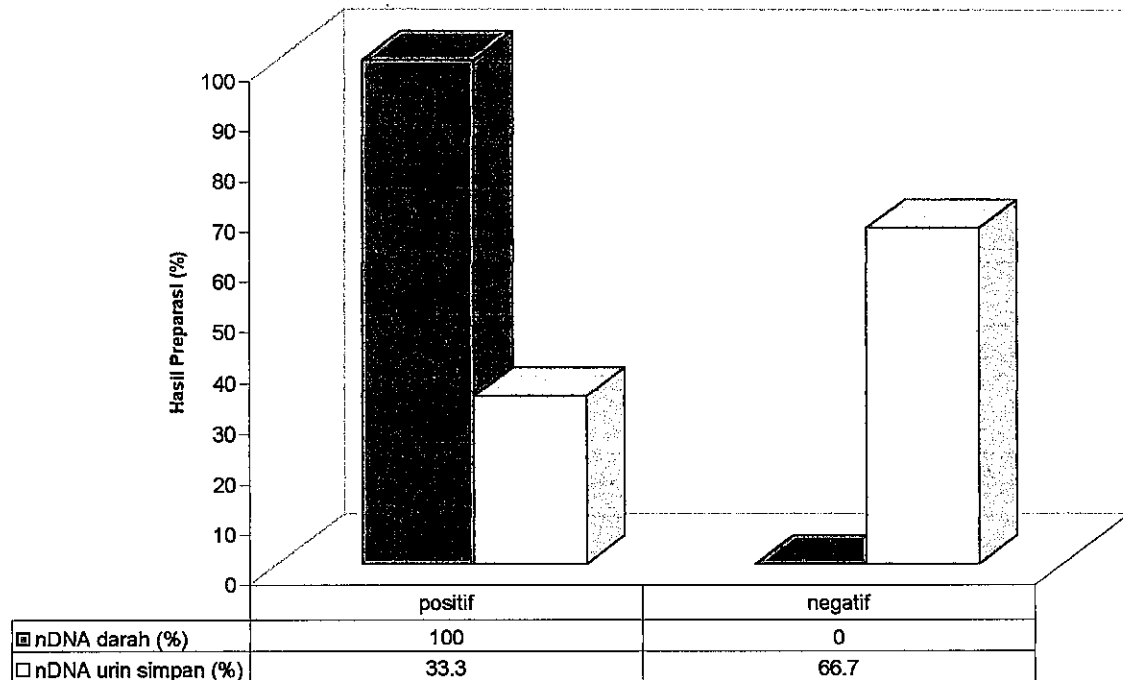
Hasilnya ditampilkan pada tabel di bawah ini :

Tabel 5. 2  
Distribusi frekuensi hasil preparasi fragmen identifikasi personal  
dari nDNA sampel darah dan urin simpan

<b>Hasil</b>	<b>nDNA darah</b>	<b>nDNA urin simpan</b>
<b>positif</b>	12	4
<b>(%)</b>	100,0	33,3
<b>Negatif</b>	0	8
<b>(%)</b>	0	66,7
<b>Total</b>	12	12
<b>(%)</b>	100,0	100,0

Dari tabel 5. 2 Terlihat bahwa hasil preparasi fragmen identifikasi personal dari nDNA sampel darah 100 % dinyatakan positif atau terdapat pembentukan pita / *band* pada gel. Sedangkan hasil preparasi fragmen identifikasi personal dari nDNA sampel urin simpan yang positif sebesar 33,3 %.

Grafik 5.1. Grafik batang hasil preparasi fragmen nDNA darah dan nDNA urin simpan



5.2.2. Hasil preparasi fragmen identifikasi personal dari mtDNA sampel darah dan urin simpan

Hasil preparasi fragmen identifikasi personal dari mtDNA sampel darah dan urin simpan dinyatakan sebagai positif (bila terbentuk pita / *band*) atau negatif (bila tidak terbentuk pita / *band*). Hasilnya ditampilkan pada tabel di bawah ini :

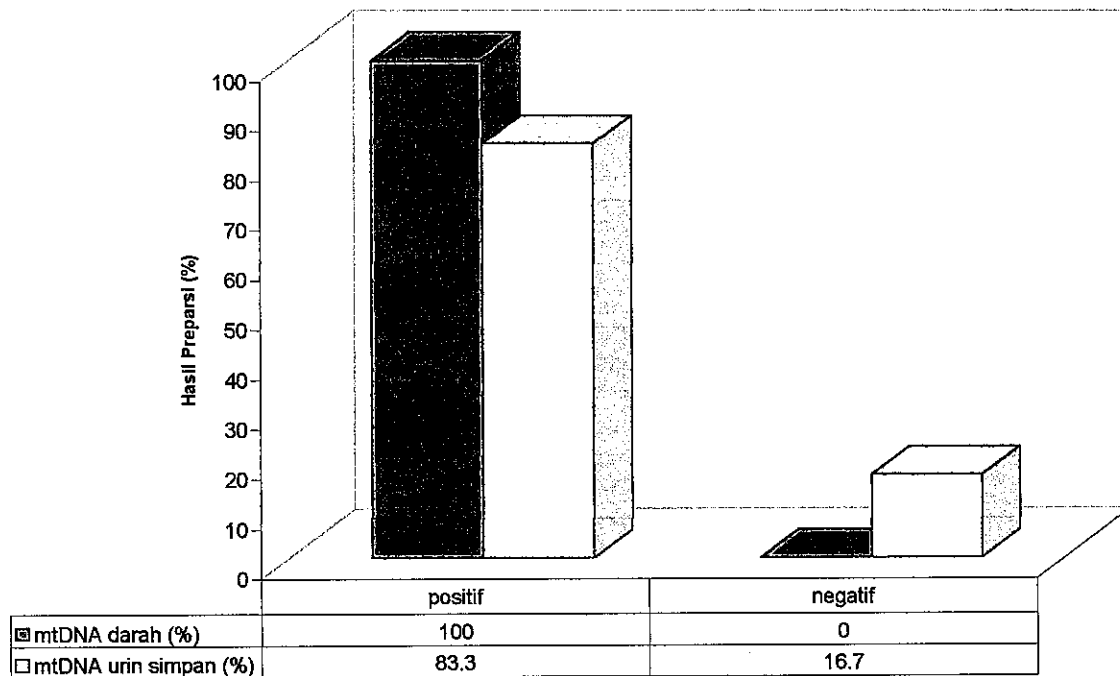
Tabel 5. 3  
Distribusi frekuensi hasil preparasi fragmen identifikasi personal  
dari mtDNA sampel darah dan mtDNA urin simpan

Hasil	mtDNA darah (%)	mtDNA urin simpan (%)
<b>Positif</b> (%)	12 100,0	10 83,3
<b>Negatif</b> (%)	0 0	2 16,7
<b>Total</b> (%)	12 100,0	12 100,0

Dari tabel 5. 3 Terlihat bahwa hasil preparasi fragmen identifikasi personal dari mtDNA sampel darah 100% dinyatakan positif atau terdapat pembentukan pita / *band* pada gel. Sedangkan hasil preparasi fragmen identifikasi personal dari mtDNA sampel urin simpan yang positif sebesar 83,3%.



Grafik 5.2. Grafik batang hasil preparasi fragmen mtDNA darah dan mtDNA urin simpan



### 5. 3. Analisis bivariat

Analisis bivariat merupakan tindak lanjut hasil analisis univariat, dilakukan terhadap hasil preparasi fragmen mtDNA (darah dan urin simpan) dan nDNA (darah dan urin simpan).

5.3.1. Rangkuman hasil distribusi silang hasil preparasi fragmen mtDNA dan nDNA darah dengan mtDNA dan nDNA urin simpan.

Hasil preparasi fragmen mtDNA dan nDNA baik dari sampel darah maupun urin simpan disajikan dengan tabel dibawah ini :

Tabel 5. 4  
Distribusi silang hasil preparasi fragmen mtDNA dan nDNA darah  
dengan mtDNA dan nDNA urin simpan

		Hasil preparasi		Jumlah
		Positif (%)	Negatif (%)	
mtDNA darah	nDNA	4 (33,3)	8 (66,7)	12 (100)
	Urin simpan			
MtDNA Darah	mtDNA	10 (83,3)	2 (16,7)	12 (100)
	Urin simpan			

Dari tabel 5.4 menunjukkan bahwa analisis silang hasil preparasi nDNA urin simpan terhadap nDNA darah yang dinyatakan positif sebesar 33,3% dari 12 sampel. Sedangkan analisis silang mtDNA urin simpan terhadap mtDNA darah hasil positif sebesar 83,3%. Sehingga bisa dinyatakan bahwa nilai positif pada pemeriksaan mtDNA urin simpan lebih tinggi dibanding nDNA urin simpan.

5.3.2. Distribusi silang hasil preparasi fragmen nDNA dengan mtDNA urin simpan.

Hasil preparasi fragmen nDNA dengan mtDNA urin simpan disajikan dalam bentuk tabel silang. Hasilnya digambarkan pada tabel di bawah ini :

Tabel 5. 5

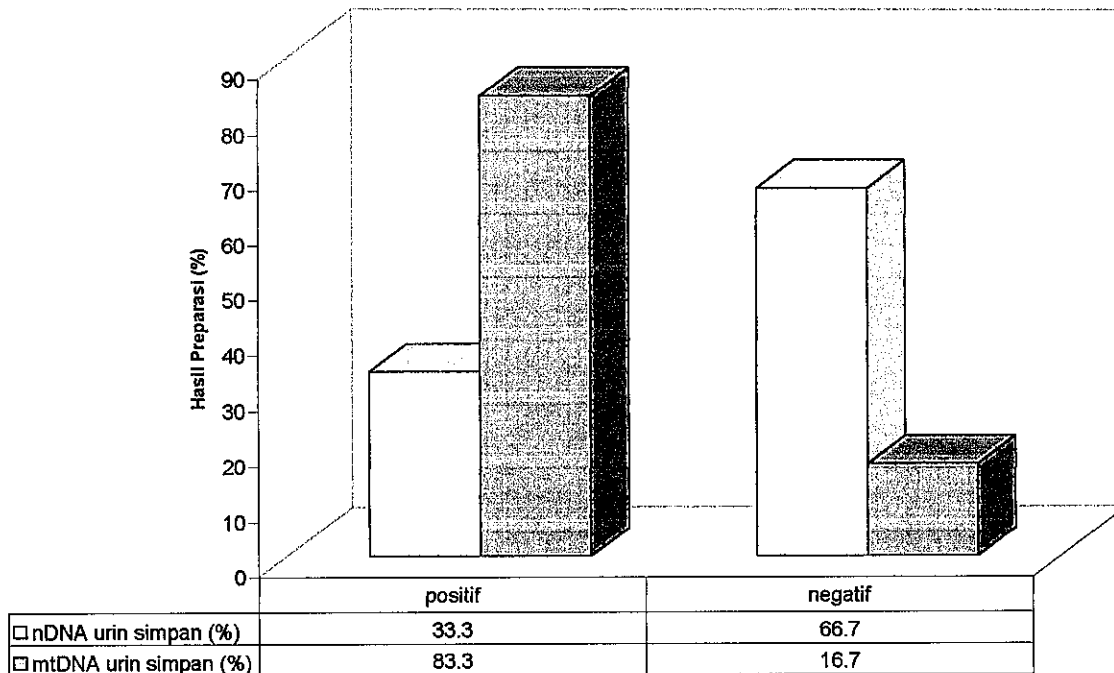
Distribusi silang hasil preparasi fragmen nDNA dengan mtDNA urin simpan.

		mtDNA urin simpan		Total
		Positif (%)	Negatif (%)	
nDNA urin simpan	Positif (%)	4 100,0	0 0	4 100,0
	Negatif (%)	6 75,0	2 25,0	8 100,0
Total (%)		10 83,3	2 16,7	12 100,0

Nilai kappa kohen : 0,182,  $p = 0,237$

Dari tabel 5.5. terlihat bahwa preparasi fragmen nDNA urin simpan dibanding mtDNA urin simpan, diperoleh hasil dari 12 sampel yang diperiksa, 4 sampel dinyatakan positif sejati (33,3%) dan 2 sampel dinyatakan negatif sejati.

Grafik 5.3. Grafik batang hasil preparasi fragmen nDNA urin simpan dan mtDNA urin simpan



### 5.3.3. Uji Kappa

Dari tabel silang diatas, diperoleh nilai kappa sebesar 0,182 dengan nilai 0,273. Hal ini berarti bahwa nilai kappa pada preparasi fragmen nDNA urin simpan dan mtDNA urin simpan mempunyai kesepakatan rendah.

## 5. 4. Analisis lanjut

Sebagai analisis lanjut dari hasil yang telah diperoleh, dilakukan melalui uji Mc. Nemar. Dengan uji Mc. Nemar diperoleh *p value* sebesar 0,03 ( $p \leq 0,05$ ). Sehingga secara statistik hasil penelitian dinyatakan berbeda bermakna.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Jumlah sampel dalam penelitian ini sebanyak 12 orang. Sampel urin dan darah diambil di laboratorium forensik FK UNDIP Semarang, kemudian diteliti di laboratorium PAU UGM Yogyakarta.

Berdasarkan pemeriksaan preparasi fragmen DNA darah dan DNA urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal diperoleh hasil :

#### 6.1 Hasil preparasi fragmen nDNA darah

Sebesar 100% sampel darah yang diperiksa preparasi fragmen nDNA positif, dengan pita / *band* yang tampak jelas pada elektroforesis gel. Hal tersebut sesuai dengan teori bahwa darah merupakan sampel referensi yang paling sering digunakan pada pemeriksaan DNA untuk identifikasi personal dengan tingkat keberhasilan 100 %.<sup>(1,31)</sup>

#### 6.2 Hasil preparasi fragmen nDNA urin simpan

Pada preparasi fragmen nDNA urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal diperoleh hasil positif sebesar 33,3%. Hasil penelitian ini jauh lebih rendah dari penelitian Benecke (2001) yang menyatakan keberhasilan DNA *typing* dari urin simpan ialah 72,7 % (8 dari 11 sampel yang diperiksa). Perbedaan hasil penelitian yang mencolok ini kemungkinan besar disebabkan karena terdapat perbedaan teknik isolasi DNA yang digunakan pada penelitian ini dibanding penelitian Benecke. Pada penelitian Benecke isolasi / ekstraksi DNA urin menggunakan *spin columns* (*Centricon spin columns*®). Metode *spin columns* merupakan isolasi DNA menggunakan filtrasi gel kromatografi yang memisahkan matriks lewat partikel gel

berukuran sangat kecil sehingga molekul kecil dapat berdifusi dan diisolasi, dilanjutkan dengan teknik sentrifugasi selektif sehingga partikel kontaminan dapat disingkirkan. Metode *spin columns* merupakan metode yang banyak digunakan untuk isolasi DNA dari sampel bercak darah yang menempel pada permukaan yang 'bermasalah' pada isolasi DNA, misalnya kulit, kotoran atau kain bernoda. Setiap *spin columns* hanya dapat digunakan untuk satu sampel saja dan merupakan *kit* yang sekali pakai, sehingga harga *spin columns* cukup mahal dan bukan merupakan teknik isolasi DNA yang rutin dilakukan di laboratorium bioteknologi di Indonesia. Sedangkan isolasi / ekstraksi DNA urin pada penelitian ini menggunakan prosedur manual yang sangat sederhana. Prosedur isolasi DNA urin pada penelitian ini merupakan modifikasi dari prosedur isolasi DNA urin oleh Noer AS dari bagian biokimia Fakultas Teknik Kimia ITB. Prosedur isolasi DNA urin tersebut ekonomis, tanpa *kit* dan menggunakan reagen dan alat yang rutin digunakan untuk isolasi DNA darah sehingga prosedur isolasi DNA urin tersebut dapat dilakukan oleh semua laboratorium di Indonesia. Selain itu Benecke menggunakan prosedur dan alat otomatis (Gibco BRL Aces Human DNA Quantitation Kit) dan menggunakan 3 *loci* STR fragmen DNA untuk identifikasi personal sebagai *primer* pada PCR (CD 4, DHFRP/HUMFOLP23, D8S306), sedangkan pada penelitian ini menggunakan metode manual sederhana tanpa *kit* dan menggunakan 1 *loci* STR fragmen DNA standar untuk identifikasi personal yang lazim digunakan (DHFRP/HUMFOLP23).<sup>(49,50)</sup>

### 6.3 Hasil preparasi fragmen mtDNA darah

Sebesar 100% sampel darah yang diperiksa preparasi fragmen mtDNA positif, dengan pita / *band* yang tampak jelas pada elektroforesis gel. Hal tersebut sesuai dengan teori bahwa darah merupakan sampel referensi yang paling sering digunakan pada pemeriksaan DNA untuk identifikasi personal dengan tingkat keberhasilan 100 %.<sup>(1,31)</sup>

### 6.4 Hasil preparasi fragmen mtDNA urin simpan

Pada preparasi fragmen mtDNA urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal diperoleh hasil positif sebesar 83,3%. Keberhasilan preparasi fragmen mtDNA urin simpan ini cukup tinggi walaupun teknik dan prosedur yang digunakan pada penelitian ini ialah teknik manual yang sederhana tanpa *kit*, yang relatif ekonomis dan dapat dilakukan di laboratorium bioteknologi sederhana di Indonesia.

Dari gambaran pita / *band* yang terbentuk dari hasil elektroforesis gel, terlihat bahwa densitas pita / *band* fragmen mtDNA dari sampel darah maupun urin simpan lebih tinggi dari densitas pita / *band* fragmen nDNA sampel darah maupun urin simpan. Hal tersebut menunjukkan bahwa kuantitas fragmen mtDNA untuk identifikasi personal lebih banyak dari fragmen nDNA.<sup>(1,17)</sup>

### 6.5 Perbedaan hasil preparasi fragmen mtDNA dibanding nDNA pada urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal.

Hasil preparasi fragmen mtDNA pada urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal ialah 83,3 % ; 2,5 kali lebih tinggi dari hasil preparasi nDNA yang hanya 33,3 %. Secara statistik menggunakan uji Mc Nemar dinyatakan bahwa terdapat

perbedaan bermakna pada hasil preparasi fragmen mtDNA dan nDNA pada urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal. ( $p = 0,03$ ).

Hasil penelitian ini mendukung teori bahwa pemeriksaan mtDNA untuk identifikasi personal sangat bermanfaat dan mempunyai keberhasilan tinggi pada sampel yang jumlah DNA-nya sangat sedikit misalnya tulang, gigi, cairan tubuh (air liur, air mani, bercak darah, urin) yang tertempel pada amplop, perangko, batang rokok atau pada sampel yang tersimpan pada periode yang lama. Hal ini disebabkan karena dalam setiap sel dapat mempunyai 1000 hingga 10.000 copy mtDNA dibanding nDNA yang hanya mempunyai 2 copy pada tiap sel <sup>(5,16,17,33,39,41)</sup>

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa pemeriksaan identifikasi personal pada kasus-kasus yang menggunakan urin simpan, misalnya pada kasus pengingkaran sampel doping atau tes narkoba, dapat digunakan pemeriksaan mtDNA yang pada pemeriksaan preparasi fragmen untuk identifikasi personal mempunyai tingkat keberhasilan lebih tinggi (83,3%) dibanding nDNA (33,3 %).



## BAB 6

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. KESIMPULAN

1. Didapatkan hasil preparasi fragmen nDNA urin simpan yang positif sebesar 33,3%, sedangkan nDNA darah 100%
2. Didapatkan hasil preparasi fragmen mtDNA urin simpan yang positif sebesar 83,3%, sedangkan mtDNA darah 100%
3. Terdapat perbedaan hasil preparasi fragmen mtDNA dibanding nDNA urin simpan untuk kepentingan identifikasi personal ( $p=0,03$ )

#### B. SARAN

1. Pada kasus-kasus identifikasi personal yang menggunakan sampel urin simpan, misalnya pada kasus pengingkaran sampel doping atau tes narkoba, sebaiknya digunakan pemeriksaan mtDNA.
2. Untuk identifikasi personal, hasil preparasi fragmen mtDNA pada penelitian ini dapat diteruskan dengan teknik *sequencing*.
3. Hasil penelitian ini dapat dikembangkan penelitian lebih lanjut menggunakan sampel DNA yang kuantitas maupun kualitas minimal, misalnya sampel jaringan yang sudah rusak karena terkubur lama, kebakaran atau ledakan bom dan lain-lain.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Rudin N, Inman K. The nature of physical evidence. In: An introduction to forensic DNA analysis. 2<sup>nd</sup> ed. New York: CEC Press; 2002: 1-11.
2. Idries AM. Identifikasi. Dalam: Pedoman ilmu kedokteran forensik. Edisi pertama. Jakarta: Binarupa Aksara; 1997:31-52.
3. Dahlan S. Identifikasi. Dalam : Ilmu kedokteran forensik, pedoman bagi dokter dan penegak hukum. Edisi ketiga. Semarang: Badan Penerbit UNDIP; 2004:149-57.
4. Luftig MA, Richey S. DNA and forensic science. New Eng. Law Rev. 2001; 35(3): 609-13.
5. Bickel P.J. Discussion of " The evaluation of forensic DNA evidence". Proc.Natl.Acad.Sci 1997; 94:5497-1.
6. Morgan JT, Hanley P, Sheinis LA. Medical genetics. New York: McGraw-Hill; 1999: 1-17.
7. Margaret AB, Suzanne J, Miles N. Raising the bar: The impact of DNA testing on the field of forensic. Proc. Natl. Acad 2001;68: 95-115.
8. How is DNA fingerprinting done ? 2003:1-12.  
<http://www.biology.washington.edu/fingerprint/elementa.html>.
9. Practical applications of DNA fingerprinting . 2004 : 1-8.  
<http://www.biology.washington.edu/fingerprint/elementa.html>.
10. Junge A, Stevens M, Madea B. Successful DNA typing of a urine sample in a doping control case using human mitochondrial DNA analysis. J forensic Sci 2002; 47(5): 1-3.
11. Yasuda T, Lida R, Takeshita H, Ueki M. A simple method of DNA extraction and STR typing from urine sample using a commercially available DNA extraction kit. J Forensic Sci. 2003;48(1): 108-10.
12. Dennis Lo YM. Molecular testing of urine: Catching DNA on the way out. Clinical Chemistry 2000;46:1039-40.
13. Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, Shelepov V. Genetic analysis of DNA excreted in urine: A new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cell dying in an organism. Clinical Chemistry 2000;46:1078-84.

14. Linfert DR, Wu AHB, Tsongalis GJ. The effect of pathologic substances and adulterants on the DNA typing of urine. *J Forensic Sci* 1996;41(4):1041-5.
15. Benecke M, Cornelia S, Staak M. Development of a fast new STR triplex system for identification of urine samples. *J Forensic Sci* 1996; 48(2):179 – 85.
16. Cann, RL, Stoneking M, Wilson, AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 1987;325: 31-6.
17. Noer AS, Martasih F, Mulyani S, Muktiningsih, Wirahadikusumah M. Analisis variasi nukleotida D-loop mtDNA manusia dari beberapa daerah di Indonesia, *Proceeding of the 1<sup>st</sup> Seminar on Chemistry Universitas Kebangsaan Malaysia-Institut Teknologi Bandung*; 1994; Bandung, Indonesia. Bandung: ITB Press, 1994.
18. Forensic odontology. 2004 ;Vol 34:1-8. <http://faculty.ncwc.edu.htm>.
19. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 2<sup>nd</sup> ed. USA: BIOS Scientific publishers Ltd ; 1999: 119-35.
20. DeWitte S. Module: forensic anthropology. 2004: 1-7. <http://www.sonoma.edu/Anthropology/awcourses/Forensic.html>.
21. Fingerprints and trace evidence. 2004: 1-15. <http://faculty.ncwc.edu/toconnor/425/425lect16.htm>.
22. DNA typing and identification. 2004: 1-6. <http://faculty.ncwc.edu/toconnor/425/425lect16.htm>.
23. Reno J, Fisher RC, Robinson L, Brennan N, Travis J. Postconviction DNA testing: Recommendation for handling requests. 1999. <http://www.ojp.usdoj.gov/nij>.
24. Curran T. *Forensic DNA analysis: Technology and application* . 1997 <http://www.parl.gc.ca/information/library/PRBpubs/bp443-e.htm>.
25. Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols. A guide to methods and applications*. California: Academic Press. Inc; 2002: 3-11

26. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Biochemistry. 24<sup>th</sup> ed. USA: Prentice-Hall International Inc; 1996: 386 – 416
27. Cheatham TE, Crowley MF, Fox T, Kollman PA. A molecular level picture of the stabilization of DNA in mixed ethanol-water solution . 2003: 1-9. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=23237>.
28. Benecke M. DNA typing in forensic medicine and in criminal investigation : a current survey. *Naturwissenschaften* 1997;84:181-8.
29. Polymeropoulos MH, Rath DS, Xiao H, Merrill CR. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosinase hydroxylase gene (TH). *Nucleic Acids Res.* 1991;19:3753.
30. Puer C, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Schumm JW. Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01 [AATG]<sub>n</sub> and reassignment of alleles on population analysis by using a locus specific ladder. *Am J. Hum Genet* 1993;53:953-8.
31. Leriche A. Final report of the interpol working party on DNA profiling. Proceeding from the 2<sup>nd</sup> European Symposium on Human Identification. England: Promega Corporation; 1998: 1-35
32. Gill P. Biological evidence (including hair). Proceeding from the 13<sup>th</sup> Interpol forensic science symposium; 2001 Oct 16-19; Lyon, France. Birmingham: Forensic Science Service; 2001:1-15
33. Sudoyo H. Polimorfisme DNA mitokondria dan kedokteran forensik. Dalam : Eijkman lecture series 1 : Mitochondrial medicine. Editor : Suryadi H, Malik SG, Gustiananda M, Sudoyo H, Marzuki S. Edisi 2. Jakarta : Lembaga Eijkman, 2003 : 53 -69.
34. Clayton DA. Nuclear gadgets in mitochondrial DNA replication and transcription. *Trends Biochem. Sci.* 1991;16: 107.
35. Kogelnik AM, Lott MT, Brown MD, Navathe SB, Wallace DC. Mitomap : a human mitochondrial genome database 1998 update. *Nucleic Acid Res.* 1998; 26(I):112 – 5.

36. Carracedo A, Bar W, Lincoln P. DNA commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial typing. *Forensic Sci Int.* 2000;110:79-85.
37. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodrigues WC, Canik JJ, Merrill CR, Weedn VW. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains : Identification of remains from the Vietnam war. *J Forensic Sci.* 1993;38(3): 542-53.
38. Stoneking M, Hedgecock D, Vigilant L. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am. J. Hum. Genet* 1991;48: 370-382.
39. Holland MM, Fisher DL, Roby RK. MtDNA match criteria. *Crime Lab Digest.* 1998;22 109-15.
40. Allen M, Engstrom AS, Meyers S, Handt O, Saldeen T. Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: Sensitivity and matching probabilities. *J Forensic Sci.* 1998;43(3): 453-64.
41. Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Schumm JW. Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01 [AATG]<sub>n</sub> and reassignment of alleles on population analysis by using a locus specific ladder. *Am J. Hum Genet.* 1993;53:953-8.
42. Beckmann R. Forensic-science from Fingerprints to DNA .2004: 1-21. <http://www.csiro.au/forensics>.
43. Urine identification by DNA typing .2004:1-8. [http://www.orchidcellmark.com/pdf/urine\\_identification.pdf](http://www.orchidcellmark.com/pdf/urine_identification.pdf).
44. Koss LG. Identification, collection, and laboratory processing of cytologic samples. In : *Diagnostic cytology of the urinary tract.* Philadelphia :Lippincott – Raven, 1995: 3-15.
45. Henry JB, Lauzon RB, Schumann GB. Urine and other body fluids. In: Henry JB editor. *Diagnosis and management by laboratory methods.* 13<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1996: 411-57.

46. Yokota M, Tatsumi N, Tsuda I, Takubo T, Hiyoshi M. DNA extraction from human urinary sediment. *J.Clin.lab.Anal.* 1998;12: 88-91.
47. Smuts AL, Pogue PD. DNA from urine as a potential source of identification. *J Forensic Sci.* 2002;24(3):5-9.
48. Wallace DC, Garrison K, Knowler W. Dramatic founder effect in Amerindian mitochondrial DNA. *Am. J. Phys. Anthr.* 1995;68:149-55.
49. Overview of nucleic acid purification and isolation. 2004: 8-9. [http://www.roche-applied-science.com/PROD\\_INF/MANUALS/napi\\_man/pdf/chapter1/page\\_08-09.pdf](http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/napi_man/pdf/chapter1/page_08-09.pdf)
50. Greenspoon SA, Scarpetta MA, Drayton ML, Turek SA. QIAamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework. *J Forensic Sci.* 1998;43(5):1024-30.