

**PENGEMBANGAN METODE MODIFIKASI EKSTRAKSI
RESIN DAN LISIS DNA SAMPEL DARAH DAN
BUCCAL SWAB HASIL KUANTIFIKASI DENGAN *REAL TIME* PCR**

SKRIPSI

AJENG TIARA PARJI SAPUTRI

062120027



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PAKUAN
BOGOR
2024**

**PENGEMBANGAN METODE MODIFIKASI EKSTRAKSI
RESIN DAN LISIS DNA SAMPEL DARAH DAN
BUCCAL SWAB HASIL KUANTIFIKASI DENGAN *REAL TIME* PCR**

SKRIPSI

Skripsi Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat untuk
Memperoleh Gelar Sarjana pada Program Studi Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Pakuan

AJENG TIARA PARJI SAPUTRI

062120027



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PAKUAN
BOGOR
2024**

LEMBAR PENGESAHAN

Judul Makalah : Pengembangan Metode Modifikasi Ekstraksi Resin Dan Lisis
DNA Sampel Darah dan *Buccal Swab* Hasil Kuantifikasi dengan
Real Time PCR

Nama : Ajeng Tiara Parji Saputri

NPM : 062120027

Program Studi : Kimia

Fakultas : MIPA

Makalah Seminar Hasil Tugas Akhir ini telah diperiksa dan disetujui,

Bogor, Juli 2024

Menyetujui

Pembimbing II

Pembimbing I

(Vira Saamia, S.Si., M.Biomed)

(Dra. Tri Aminingsih, M.Si)

NIP. 198605192008122001

NIDN. 0417026601

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kimia

Dekan FMIPA

(Dr. Ade Heri Mulyati, M. Si)

(Asep Denih, S.Kom, M.Sc, Ph.D)

NIDN. 0427067401

NIDN. 0406097101

RIWAYAT HIDUP



Ajeng Tiara Parji Saputri, dilahirkan di Bogor pada tanggal 1 Agustus 2000, anak pertama dari pasangan Bapak IPDA Parji, S.H. dan Ibu Lidia Hartanti. Penulis menyelesaikan pendidikan sekolah dasar di SDN Cibuluh 2, Kota Bogor (2006-2012), sekolah menengah pertama di SMPN 8 Kota Bogor (2012-2015), dan sekolah menengah atas di SMK Farmasi Tunas Mandiri Kota Bogor (2015-2018).

Pada tahun 2018 penulis pernah mengikuti Pendidikan Kepolisian di Sekolah Polisi Wanita selama 7 bulan dan Pendidikan Pengembangan Spesialisasi Polri Bintara Laboratorium Forensik di Diklat Reserse Lemdiklat Polri Mega Mendung, Bogor selama 1 bulan (Januari 2022-Februari 2022). Pada Tahun 2020, penulis melanjutkan Pendidikan ke Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Pakuan di Bogor pada Program Studi Kimia. Pada tahun 2019-sekarang bekerja di Pusat Laboratorium Forensik Bareskrim Polri.

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ajeng Tiara Parji Saputri
NPM : 062120027
Judul Skripsi : Pengembangan Metode Modifikasi Ekstraksi
Resin Dan Lisis DNA Sampel Darah dan *Buccal Swab* Hasil Kuantifikasi dengan *Real Time PCR*

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi ini merupakan hasil penelitian, pemikiran dan pemaparan asli saya sendiri. Saya tidak mencantumkan tanpa pengakuan bahan bahan yang telah dipublikasikan sebelumnya atau ditulis oleh orang lain, atau sebagian bahan yang pernah diajukan untuk gelar atau ijazah pada Universitas Pakuan atau perguruan tinggi lain.

Apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, saya bersedia menerima sanksi akademi sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Pakuan.

Demikian pernyataan ini saya buat.

Bogor, Juli 2024
Yang membuat pernyataan,

Ajeng Tiara Parji Saputri
062120027

**PERNYATAAN MENGENAI TUGAS AKHIR DAN SUMBER
INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA DAN PATEN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ajeng Tiara Parji Saputri
NPM : 062120027
Judul Skripsi : Pengembangan Metode Modifikasi Ekstraksi
Resin Dan Lisis DNA Sampel Darah dan *Buccal*
Swab Hasil Kuantifikasi dengan *Real Time* PCR

Dengan ini saya menyatakan bahwa tugas akhir diatas adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun.

Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tugas akhir ini. Dengan ini saya melimpahkan hak cipta karya tulis saya kepada Universitas Pakuan.

Bogor, Juli 2024
Yang membuat pernyataan,

Ajeng Tiara Parji Saputri
062120027

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang merupakan syarat untuk menyelesaikan studi serta dalam rangka untuk memperoleh gelar sarjana studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan dengan judul "**Pengembangan Metode Modifikasi Ekstraksi Resin Dan Lisis DNA Sampel Darah dan *Buccal Swab* Hasil Kuantifikasi dengan *Real Time PCR***".

Dalam penulisan skripsi ini penulis menemukan beberapa kendala dan hambatan. Namun atas izin Allah SWT, dorongan dan motivasi dari banyak pihak penulis mampu menyelesaikan tepat pada waktunya. Sehingga pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah memberikan kontribusinya berupa ilmu pengetahuan, bantuan moril maupun material baik secara langsung maupun tidak langsung :

1. Bapak Asep Denih, S.Kom., M.Sc., Ph.D selaku Dekan FMIPA Universitas Pakuan Bogor.
2. Ibu Ade Heri Mulyati, M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia FMIPA Universitas Pakuan Bogor.
3. Ibu Dra. Tri Aminingsih, M.Si. dan Ibu Vira Saamia, S.Si., M.Biomed selaku Dosen Pembimbing yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam memberikan bimbingan dan pengarahan kepada penulis.
4. Seluruh dosen Program Studi Kimia FMIPA Universitas Pakuan Bogor atas ilmu yang telah diberikan dan seluruh staf Tata Usaha FMIPA Universitas Pakuan Bogor atas segala kemudahan dan bantuan yang telah diberikan.
5. Teristimewa untuk Suami, Ibu dan Papa, Ibu dan Ayah serta seluruh anggota keluarga tercinta yang senantiasa mendoakan dan selalu memotivasi hingga penulis bisa menyelesaikan makalah ini.
6. Seluruh pihak yang namanya tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan sehingga makalah ini dapat diselesaikan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna karena keterbatasan ilmu dan pengalaman yang dimiliki. Oleh karenanya, saran dan kritik yang bersifat membangun akan penulis terima dengan senang hati. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang memerlukan.

Bogor, Juli 2024

Ajeng Tiara Parji Saputri

Ajeng Tiara Parji Saputri. 062120027. “Pengembangan Metode Modifikasi Ekstraksi Resin Dan Lisis DNA Sampel Darah dan *Buccal Swab* Hasil Kuantifikasi Dengan *Real Time PCR*”. Di bawah bimbingan Dra. Tri Aminingsih, M.Si. Dan Vira Saamia, S. Si., M. Biomed.

RINGKASAN

Deoxyribonucleic Acid (DNA) adalah materi genetik penting untuk analisis medis, ilmiah, dan forensik. Metode ekstraksi resin dan lisis efektif menghasilkan DNA berkualitas dengan cepat. Isolasi DNA penting untuk kuantifikasi yang akurat, menghilangkan inhibitor, dan menghindari kontaminasi. Darah dan buccal swab adalah sampel umum untuk isolasi DNA. Modifikasi metode ekstraksi dapat meningkatkan efisiensi dan hasil kuantifikasi DNA. Penelitian dilakukan untuk menentukan dan membandingkan hasil kuantitas DNA dari tiga metode ekstraksi DNA.

Metode penelitian meliputi metode ekstraksi resin, metode ekstraksi lisis dan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis pada sampel darah kering dan *buccal swab* yang dikuantifikasi menggunakan *Real Time PCR*. Pada metode modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis menggunakan pertukaran ion (*ion exchange*) dimana ion Mg^{2+} akan diikat oleh resin *Chelex* dan pemberian magnetik partikel adalah proses purifikasi DNA menggunakan lisis, yaitu untuk memisahkan DNA dari kontaminan yang terdapat pada sampel sehingga sampel menghasilkan kuantitas DNA yang lebih tinggi.

Hasil uji kuantitatif dengan menggunakan *Real Time PCR* menunjukkan bahwa modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis menghasilkan kuantitas DNA yang lebih tinggi dibandingkan metode resin dan metode lisis. Nilai *T. Large Autosomal*, *T. Small Autosomal*, dan *T. IPC* yang lebih tinggi menunjukkan peningkatan kuantitas DNA, sementara nilai *Degradation Index* yang lebih rendah menunjukkan degradasi DNA yang lebih sedikit. Secara keseluruhan, modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis ini lebih efektif dan andal untuk analisis profil DNA.

Kata kunci : Ekstraksi DNA, Darah, *Buccal Swab*, Modifikasi Metode Ekstraksi Resin dan Lisis, Kuantitas DNA, *Real Time PCR*

Ajeng Tiara Parji Saputri. 062120027. “Development of Modified Resin and Lysis DNA Extraction Methods for Blood and Buccal Swab Samples Quantification Results Using Real Time PCR”. Under the guidance of Dra. Tri Aminingsih, M.Si. and Vira Saamia, S. Si., M. Biomed.

SUMMARY

Deoxyribonucleic Acid (DNA) is crucial genetic material for medical, scientific, and forensic analyses. The Resin and Lysis extraction methods effectively yield high-quality DNA rapidly. DNA isolation is essential for accurate quantification, inhibitor removal, and contamination prevention. Blood and buccal swabs are common samples for DNA isolation. Modifying extraction methods can enhance efficiency and DNA quantity. Research aims to determine and compare DNA quantity outcomes using three DNA extraction methods.

Methods include Resin extraction, Lysis extraction, and a modified Resin and Lysis method using Real Time PCR with dried blood spot and buccal swab samples. In the modified method, ion exchange with Chelex resin binds Mg²⁺ ions, and magnetic particles aid DNA purification process using the lysis method by separating it from contaminants, thereby yielding higher DNA quantities.

Quantitative testing via Real Time PCR shows the modified Resin and Lysis method produces higher DNA quantities compared to Resin and Lysis methods alone. Higher values of T. Large Autosomal, T. Small Autosomal, and T. IPC indicate increased DNA quantity, while lower Degradation Index values signify less DNA degradation. Overall, the modified Resin and Lysis extraction method proves more effective and reliable for DNA profiling.

Keywords: *DNA Extraction, Blood, Buccal Swab, Modified Resin and Lysis Extraction Method, DNA Quantity, Real Time PCR*

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
RINGKASAN	iii
SUMMARY	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Hipotesis Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. DNA	5
2.1.1 DNA dalam Forensik	5
2.1.2 Sejarah Identifikasi DNA	6
2.1.3 DNA	7
2.1.4 Perolehan dan Penyimpanan Sampel	9
2.1.5 Pemeriksaan DNA	9
2.1.5.1 Isolasi DNA	11
2.1.5.2 Kuantifikasi DNA	12
2.2. Darah	13
2.3. <i>Buccal Swab</i>	14
2.4. Metode Resin	15
2.5. Metode Lisis	16
2.6. <i>Real Time PCR</i>	16
2.7. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	18
2.8. Analisis Fragmen	19
BAB III BAHAN DAN METODE	21
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	21

3.2 Bahan.....	21
3.3 Alat.....	21
3.4 Metode Penelitian.....	21
3.4.1 Preparasi Sampel.....	21
3.4.2 Ekstraksi DNA dengan metode Resin.....	22
3.4.3 Isolasi DNA dengan Metode Ekstraksi Lisis	23
3.4.4 Isolasi DNA dengan Modifikasi Metode Ekstraksi Resin dan Lisis.....	23
3.4.5 Kuantifikasi DNA	26
3.4.6 Amplifikasi DNA	27
3.4.7 Elektroforesis Kapiler	27
3.4.8 Analisis Data	27
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Hasil Kuantifikasi DNA.....	29
4.2 Hasil Elektroforesis Kapiler.....	40
BAB V PENUTUP.....	43
5.1 Kesimpulan	43
5.2 Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN.....	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Struktur dan komponen untai ganda DNA (Cummings, 2001)	7
Gambar 2.	DNA inti dan DNA mitokondria pada manusia (Lutfig and Richey, 2000)	8
Gambar 3.	Langkah-langkah Ekstraksi DNA (Cahyono, 2019).....	12
Gambar 4.	Kuantitas DNA untuk PCR (Butler, 2006)	13
Gambar 5.	Sel darah (Sciencebooth, 2014)	14
Gambar 6.	Mukosa <i>Buccal</i> (Pathologyoutlines, 2021).....	14
Gambar 7.	Struktur Kimia Resin <i>Chelex</i>	15
Gambar 8.	Cuplikan Elektroferogram Sampel Darah Perwakilan (a) Metode Resin, (b) Metode Lisis dan (c) Modifikasi Metode Resin dan Lisis.....	41
Gambar 9.	Cuplikan Elektroferogram <i>Buccal Swab</i> Perwakilan (a) Metode Resin, (b) Metode Lisis dan (c) Modifikasi Metode Resin dan Lisis	42

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Perbedaan DNA Inti dengan DNA Mitokondria (Lutfig dan Richey, 2000).....	9
Tabel 2. Pengenceran standar DNA menggunakan <i>buffer TE-4</i> (Maguire, 2013)	26
Tabel 3. Hasil Kuantifikasi DNA Sampel Darah dengan tiga metode menggunakan Real Time PCR	30
Tabel 4. Hasil Kuantifikasi DNA <i>Buccal Swab</i> dengan tiga metode menggunakan Real Time PCR	32
Tabel 5. Hasil Uji Duncan Interaksi Ketiga Metode.....	34
Tabel 6. Mekanisme Ketiga Metode Ekstraksi	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian.....	54
Lampiran 2. Hasil Uji Anova dan Uji Duncan.....	59
Lampiran 3. Hasil Elektroferogram	63
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian.....	69

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keberhasilan penegakan hukum dan peradilan pidana seringkali bergantung pada kemampuan untuk mengumpulkan dan menganalisis bukti-bukti yang kuat terhadap kejahatan yang terjadi. Kejahatan terhadap nyawa (pembunuhan) di Indonesia cenderung mengalami kenaikan dalam lima tahun terakhir. Pada 2023, jumlahnya melonjak menjadi 288.472 kasus (tertinggi dalam lima tahun). Jumlah ini turun lagi menjadi 276.507 kasus pada tahun 2022 dan kembali menurun menjadi 257.743 kasus pada tahun 2021 (Badan Pusat Statistik, 2018). Peningkatan tersebut menyebabkan Kepolisian Negara Republik Indonesia membentuk suatu kewenangan khusus dengan tugas mengidentifikasi pelaku dan korban secara molekuler dalam semua tindak pidana, yaitu Pusat Laboratorium Forensik, khususnya bagian Biologi Serologi Forensik. Tes identifikasi, isolasi dan kuantifikasi DNA dilakukan di laboratorium pengujian biomolekuler untuk mendapatkan profil DNA yang benar. Itu sebabnya tes DNA merupakan langkah cepat dalam memecahkan kejahatan (Yudianto dan Kusuma, 2002).

Deoxyribonucleic Acid (DNA) merupakan materi genetik yang mengandung informasi genetik dari suatu organisme. Analisis DNA menjadi sangat penting dalam berbagai bidang, termasuk diagnostik medis, penelitian ilmiah, forensik, dan pemahaman tentang keanekaragaman hayati. Diperlukan isolasi DNA yang efisien dan berkualitas untuk melakukan analisis genetik yang akurat dan andal. Proses isolasi DNA, pemilihan metode ekstraksi yang tepat memiliki peran dalam memastikan kualitas dan kuantitas DNA yang diperoleh. Salah satu metode ekstraksi yang banyak digunakan adalah metode ekstraksi resin dan lisis. Metode ekstraksi ini telah terbukti efisien dan dapat menghasilkan DNA dengan kualitas yang baik dalam waktu yang relatif singkat. Dalam penelitian biologi molekuler dan genetika, kuantifikasi DNA merupakan langkah yang mendasar dan penting untuk memastikan keberhasilan berbagai analisis genetik berikutnya. Hasil isolasi DNA menjadi prasyarat untuk kuantifikasi yang akurat karena memberikan estimasi yang tepat mengenai jumlah DNA yang dapat digunakan dalam berbagai

teknik analisis. Selain memungkinkan kuantifikasi yang tepat, isolasi DNA juga memungkinkan evaluasi kemurnian dan kualitas DNA yang diekstraksi. DNA yang terisolasi dengan baik akan memiliki kemurnian yang tinggi, bebas dari kontaminan seperti protein, RNA, dan senyawa kimia lainnya yang dapat mengganggu analisis genetik. Dengan demikian, hasil isolasi DNA yang baik akan memberikan dasar yang kuat untuk kuantifikasi DNA yang akurat serta analisis genetik yang andal (Tozzo *et al.*, 2014).

Proses isolasi DNA juga penting untuk menghilangkan atau mengurangi inhibitor yang mungkin terkandung dalam sampel biologis. Inhibitor ini dapat mengganggu reaksi kuantifikasi DNA atau analisis genetik lainnya, sehingga isolasi DNA menjadi langkah yang penting untuk memastikan bahwa kuantifikasi dilakukan dalam kondisi yang optimal. Selain itu, isolasi DNA juga membantu menghindari kontaminasi silang antar-sampel yang dapat terjadi selama proses manipulasi dan analisis sampel. Hasil isolasi DNA menjadi langkah awal yang krusial dalam analisis genetik, termasuk dalam penelitian tentang kuantitas DNA dari sampel darah dan *buccal swab*. Kemampuan untuk memperoleh DNA dengan kemurnian yang tinggi, konsentrasi yang tepat, dan bebas dari inhibitor atau kontaminasi adalah kunci untuk mendapatkan hasil kuantifikasi DNA yang akurat dan valid, yang pada gilirannya akan memberikan dasar yang kokoh untuk interpretasi data genetik dan makna biologis yang lebih mendalam.

Sampel darah dan *buccal swab* telah menjadi pilihan yang umum dalam isolasi DNA karena ketersediaan, kemudahan pengambilan, dan representasi genom yang luas. Darah mengandung berbagai jenis sel, termasuk sel darah putih dan sel darah merah, yang dapat memberikan informasi genetik yang bervariasi. Sementara itu, *buccal swab* mengandung DNA dari sel epitel di dalam rongga mulut, memberikan informasi genetik yang unik. Penggunaan metode ekstraksi resin dan lisis untuk isolasi DNA dari sampel darah dan *buccal swab*, perlu dilakukan penelitian yang mendalam untuk memahami kuantitas DNA yang dihasilkan dari kedua metode ini. Evaluasi kuantitas DNA dari hasil isolasi tersebut menjadi penting dalam menentukan efisiensi dan keandalan metode ekstraksi dalam menghasilkan DNA yang memadai untuk analisis genetik yang beragam (Yudianto dan Kusuma, 2002; Paridah *et al.*, 2016).

Metode ekstraksi DNA merupakan langkah kunci dalam berbagai penelitian biologi molekuler, genetika, dan aplikasi diagnostik. Pemilihan metode ekstraksi DNA yang efisien dan andal menjadi kunci dalam memastikan keberhasilan analisis genetik dan kualitas hasil yang diperoleh. Dalam beberapa tahun terakhir, metode ekstraksi DNA menggunakan resin dan lisis telah menjadi pilihan yang umum dalam isolasi DNA dari berbagai jenis sampel. Metode ekstraksi ini telah terbukti efektif dalam menghasilkan DNA dengan kualitas yang baik dalam waktu yang relatif singkat. Metode ekstraksi Resin dan Lisis telah digunakan secara luas, ada potensi untuk melakukan modifikasi terhadap prosedur ekstraksi ini untuk meningkatkan efisiensi, kecepatan, dan kualitas hasil DNA yang dihasilkan. Modifikasi metode ekstraksi Resin dan Lisis dapat melibatkan sejumlah perubahan, termasuk modifikasi pada konsentrasi reagen, perubahan pada prosedur pengadukan, atau penambahan langkah-langkah tambahan untuk meningkatkan hasil ekstraksi DNA.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Menentukan kuantitas DNA dari hasil isolasi sampel darah dengan metode ekstraksi resin, metode ekstraksi lisis dan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis.
2. Menentukan kuantitas DNA dari hasil isolasi *buccal swab* dengan metode ekstraksi resin, metode ekstraksi lisis dan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis.
3. Membandingkan kuantitas DNA dari hasil isolasi sampel darah dan *buccal swab* dengan metode ekstraksi resin, metode ekstraksi lisis dan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis.

1.3 Hipotesis Penelitian

Terdapat peningkatan pada kuantitas DNA dari hasil isolasi sampel darah dan *buccal swab* dengan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis dibandingkan dengan metode ekstraksi resin dan metode ekstraksi lisis.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan ilmiah lebih lanjut mengenai perbedaan dan peningkatan kuantitas DNA dari hasil isolasi sampel darah dan *buccal swab* dengan metode ekstraksi resin, metode ekstraksi lisis dan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis. Hasilnya dapat dijadikan sebagai rekomendasi untuk memilih metode ekstraksi yang efektif dan efisien untuk pemeriksaan DNA terhadap sampel darah dan *buccal swab* karena dari masing-masing metode dan hasil memberikan kelebihan dan kelemahan untuk keperluan dalam pemeriksaan barang bukti DNA pada kasus-kasus kriminal.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Deoxyribonucleic acid* (DNA)

2.1.1 DNA Forensik

Pemeriksaan identifikasi forensik merupakan pemeriksaan yang pertama kali dilakukan, terutama pada kasus tindak kejahatan yang korbannya tidak dikenal walaupun identifikasi juga bisa dilakukan pada kasus non kriminal seperti kecelakaan, korban bencana alam dan perang, serta kasus paternitas (menentukan orang tua). Secara biologis, pemeriksaan identifikasi korban bisa dilakukan dengan odontologi (gigi-geligi), anthropologi (ciri tubuh), golongan darah serta sidik DNA. Sidik DNA merupakan gambaran pola potongan DNA dari setiap individu (Pertiwi dan Yulianti, 2011).

Seperti halnya sidik jari (*fingerprint*) yang telah lama digunakan oleh detektif dan laboratorium kepolisian sejak tahun 1930. Pada tahun 1980, Alec Jeffreys dengan teknologi DNA berhasil mendemonstrasikan bahwa DNA memiliki bagian-bagian pengulangan (sekuen) yang bervariasi. Hal ini dinamakan polimorfisme, yang dapat digunakan sebagai sarana identifikasi spesifik (individual) dari seseorang. Perbedaan sidik DNA setiap orang atau individu layaknya sidik jari, sidik DNA ini juga bisa dibaca. Tidak seperti sidikjari pada ujung jari seseorang yang dapat diubah dengan operasi, sidik DNA tidak dapat dirubah. Beberapa kelebihan tes DNA dibandingkan dengan pemeriksaan konvensional lainnya adalah sebagai berikut (Marks *et al.*, 1996) :

1. Ketepatan yang tinggi

Dalam pemeriksaan DNA dapat memberikan hasil yang membedakan seorang individu dari individu yang lain secara spesifik.

2. Kestabilan yang tinggi

DNA bersifat tahan pembusukan dibandingkan dengan protein.

3. Pemilihan sampel yang luas

DNA terdapat pada seluruh sel tubuh yang bernukleus.

4. Dapat mengungkap kasus-kasus seperti penentuan keayahan, kasus *incest*, kasus paternitas dengan bayi dalam kandungan, kasus paternitas dengan bayi

yang sudah meninggal, dan kasus paternitas untuk menentukan orang tua bayi secara biologis.

5. Dapat mengungkap kasus perkosaan dengan banyak pelaku, pemeriksaan DNA dapat memastikan berapa orang pelaku dan siapa saja pelakunya.
6. Sensitivitas yang amat tinggi
Dapat dilakukan pemeriksaan dengan sampel yang sangat sedikit.
7. Kestabilan yang tinggi
DNA bersifat tahan pembusukan dibandingkan dengan protein.
8. Pemilihan sampel yang luas
DNA terdapat pada seluruh sel tubuh yang bernukleus.
9. Dapat mengungkap kasus-kasus seperti penentuan keayahan, kasus *incest*, kasus paternitas dengan bayi dalam kandungan, kasus paternitas dengan bayi yang sudah meninggal, dan kasus paternitas untuk menentukan orang tua bayi secara biologis.
10. Dapat mengungkap kasus perkosaan dengan banyak pelaku, pemeriksaan DNA dapat memastikan berapa orang pelaku dan siapa saja pelakunya.
11. Sensitivitas yang amat tinggi
Dapat dilakukan pemeriksaan dengan sampel yang sangat sedikit.

2.1.2 Sejarah Identifikasi DNA

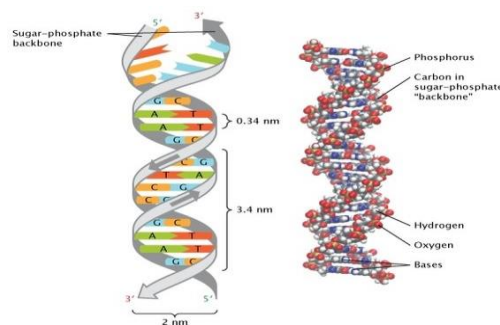
Sejarah identifikasi DNA dimulai setelah Wyman dan White pada tahun 1869 meneliti fenomena polimorfisme DNA melalui pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi, yang kemudian disebut *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLPs). Lima tahun kemudian, Alex Jeffreys mengemukakan hasil penelitiannya tentang minisatelit pada rangkaian DNA manusia. Jeffreys dan rekan-rekannya sedang menganalisis gen mioglobin ketika melihat fenomena suatu daerah sepanjang 33 bp yang terdiri atas urutan DNA berulang (*tandem repeat*). Daerah ini kemudian disebut minisatelit. Penelitian lebih lanjut ternyata menunjukkan adanya variasi jumlah pengulangan pada minisatelit lain dan unik untuk setiap individu. Selanjutnya, banyak penemuan lain yang menjadi milestone identifikasi DNA seperti *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR), teknologi *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan lain-lain. Dalam bidang forensik, DNA *fingerprinting* pertama kali diaplikasikan pada tahun 1987

untuk menganalisis sampel cairan semen dari dua buah kasus pembunuhan. Kasus pertama terjadi tahun 1983 dan kasus kedua terjadi tahun 1986. Masing-masing korban dari kasus tersebut adalah seorang gadis yang ditemukan terbunuh setelah sebelumnya diperkosa. Kasus ini kemudian menjadi spektakular karena pemeriksaan DNA yang dilakukan mengeksklusi tersangka, Richard Buckladn, dan membawa nama baru ke dalam kasus, Colin Pitchfork, yang selanjutnya menjadi terdakwa. Sejak saat itu, pemanfaatan DNA pada bidang forensik menjadi sangat banyak, mengalahkan berbagai metode serologis identifikasimateri biologis sebelumnya, seperti pemeriksaan serologis (Marks *et al.*, 1996).

2.1.3 Deoxyribonucleic acid (DNA)

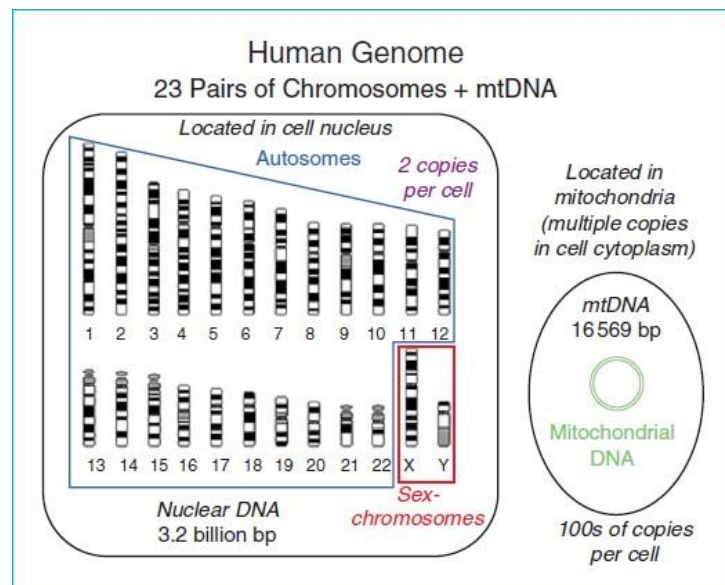
Deoxyribonucleic acid (DNA) adalah polimer asam nukleat yang tersusun secara sistematis dan membawa informasi genetik yang diwariskan kepada keturunannya. Informasi genetik diatur dalam bentuk kodon, yang merupakan tiga pasangan basa nukleotida.

Secara struktural, DNA adalah polimer nukleotida, dimana setiap nukleotida terdiri dari gula deoksiribosa, fosfat, dan basa. Polimer membentuk struktur heliks ganda beruntai dua yang disatukan oleh ikatan hidrogen antara basa-basa yang ada. DNA terdiri dari empat basa, yaitu adenin (A), sitosin (C), guanin (G) dan timin (T). Adenin membentuk dua ikatan hidrogen dengan timin sedangkan guanin membentuk tiga ikatan hidrogen dengan sitosin. Kombinasi jumlah dan susunan koneksi dasar ini memungkinkan setiap individu memiliki cetak biru genetik khusus dibandingkan dengan organisme lain.



Gambar 1. Struktur dan komponen untai ganda DNA
(Cummings, 2001)

DNA pada makhluk hidup terdapat pada inti sel, mitokondria dan klorofil. Pada manusia, DNA terdapat di dalam inti sel dan mitokondria. DNA inti berbentuk linier dan memiliki sekitar 3 miliar pasangan basa, sedangkan DNA mitokondria (mtDNA) berbentuk sirkular dan memiliki pasangan basa yang lebih sedikit, sekitar 160.000 pasangan basa. Namun, ketika mutasi terjadi pada DNA mitokondria, kerusakan dapat terjadi pada sistem yang peka energi seperti sistem saraf dan otot (Lutfig dan Richey, 2000).



Gambar 2. DNA inti dan DNA mitokondria pada manusia
(Lutfig dan Richey, 2000)

Unit hidup terkecil manusia adalah sel, rata-rata orang terdiri dari 100 triliun sel. Letak DNA di dalam inti sel disebut DNA inti, sedangkan DNA di luar inti sel disebut DNA ekstras nuklear, yang terdapat di dalam mitokondria tempat sel menghasilkan energi. DNA yang terletak pada mitokondria mempunyai beberapa perbedaan antara lain:

Tabel 1. Perbedaan DNA Inti dengan DNA Mitokondria (Lutfig dan Richey, 2000)

	DNA Inti	DNA Mitokondria
Ukuran genom	3 juta bp	16.569 bp
Kopi per sel	2 (1 dari tiap induk)	Bisa lebih dari 1000
Struktur	Linier, terbungkus kromosom	Sirkuler
Diturunkan dari	Ayah dan Ibu (kecuali Y)	Ibu
Keunikan	Unik untuk tiap individu (kecuali saudara kembar identik)	Tidak sepenuhnya unik/khas
Tingkat mutasi	Rendah	5-10 kali DNA inti

2.1.4 Perolehan dan Penyimpanan Sampel

Perolehan sampel DNA untuk pemeriksaan DNA forensik sangat beragam tergantung banyak sampel yang diperoleh dari sisa-sisa tempat kejadian perkara (TKP) atau sengaja diambil dari individu yang akan diperiksa seperti keluarga korban, atau tersangka, dan untuk uji paternitas. Contoh spesimen yang dapat digunakan untuk pemeriksaan DNA adalah darah, urine, semen, buccal swab, swab vagina, rambut, gigi, tulang, jaringan dan spesimen biologis pada tempat kejadian perkara: pada baju atau tubuh korban, pada benda yang digunakan, di lokasi kejadian.

Penanganan barang dengan spesimen DNA harus dilakukan dengan hati-hati supaya menghindari kontaminasi, penanganan harus dilakukan tanpa menyentuh benda dengan tangan kosong, tidak batuk atau bersin di depan benda, setiap barang harus dibungkus secara terpisah, penyimpanan spesimen harus dalam keadaan kering, dan setiap benda harus diberi label dengan jelas mengenai identitas (bila diketahui) dan waktu pengambilan sampel.

2.1.5 Pemeriksaan DNA

Pemeriksaan DNA adalah upaya untuk membandingkan antara profil DNA barang bukti dengan pembanding sehingga dapat disimpulkan apakah profil DNA barang bukti cocok (*match*) dengan pembanding atau tidak. Pola pewarisan spesifik pada DNA inti dan DNA mitokondria menentukan teknis identifikasi DNA. Identifikasi DNA inti dapat dilakukan dari semua sel tubuh yang memiliki inti.

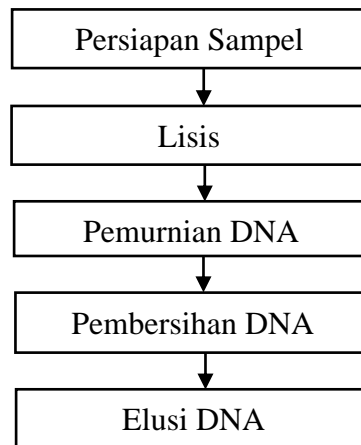
Sampel yang didapatkan dari TKP harus diperlakukan sebagai barang bukti. Oleh karena itu, pengumpulan sampel harus dilakukan dengan hati-hati, disimpan dan diawetkan agar hasil pemeriksaan dapat digunakan dalam pengadilan. Pengumpulan sampel yang buruk dapat menyebabkan DNA terdegradasi atau fragmen DNA yang terlalu pendek sehingga sulit untuk dianalisis. Aspek penting lain adalah menjaga agar sampel tidak terkontaminasi. Beberapa spesimen biologis yang sering didapatkan pada TKP dan dijadikan material pemeriksaan DNA diantaranya adalah darah, tulang, ketombe, rambut, feses, kuku, sidik jari, sekret hidung dan telinga, saliva, keringat, urin, semen, dan cairan vagina. Tiap jenis spesimen biologis memiliki standar prosedur pengambilan dan pengawetan sampel tersendiri. Identifikasi DNA sampel terdiri atas lima langkah:

1. Pemeriksaan pendahuluan terhadap sampel
Memastikan sampel biologis (seperti darah atau saliva) berkualitas baik dan tidak terkontaminasi, serta mencatat dan mengukur jumlah serta kualitas DNA yang ada.
2. Ekstraksi DNA
Mengisolasi DNA dari sel atau jaringan dengan memecah sel, memisahkan DNA dari komponen lainnya, dan memurnikan DNA untuk analisis lebih lanjut.
3. Amplifikasi DNA yang telah diekstrak menggunakan PCR
Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk memperbanyak segmen spesifik DNA sehingga cukup banyak untuk dianalisis.
4. Pemisahan dan visualisasi profil DNA
Memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran menggunakan elektroforesis gel, dan kemudian mewarnai serta memvisualisasikan DNA untuk membentuk profil DNA yang dapat dilihat.
5. Membandingkan dan interpretasi profil DNA
Membandingkan profil DNA yang diperoleh dengan profil lain atau database untuk mengidentifikasi kesamaan atau perbedaan, dan membuat kesimpulan terkait identitas atau hubungan genetik (Pertiwi dan Yulianti, 2011).

2.1.5.1 Isolasi DNA

Molekul DNA harus dipisahkan dari material seluler lainnya sebelum dapat diperiksa. Protein sel yang menyelubungi dan melindungi DNA dapat menghambat kemampuan menganalisis DNA. Oleh karena itu, metode untuk mengisolasi DNA telah dikembangkan untuk memisahkan protein dan materi seluler lainnya dari molekul DNA. Selain itu, kuantitas dan kualitas DNA sering diukur sebelum proses lanjutan lainnya untuk memastikan akan didapatkan hasil yang optimal.

Isolasi DNA secara umum memiliki tahapan-tahapan yang meliputi persiapan sampel, dimana sampel biologis seperti jaringan, darah, atau buccal swab dipersiapkan sesuai protokol yang ditentukan. Selanjutnya, sel-sel dalam sampel dipecah (lisis) menggunakan larutan lisis yang mengandung detergen dan enzim proteolitik untuk menghancurkan membran sel dan menginaktivasi enzim yang dapat menghancurkan DNA. Setelah lisis sel, DNA dipisahkan dari komponen lain dalam sampel seperti protein, lipid, dan RNA menggunakan teknik seperti presipitasi dengan etanol, filtrasi, atau sentrifugasi gradien densitas. Tahap selanjutnya adalah pembersihan DNA dari kontaminan yang tersisa seperti garam, detergen, atau enzim dengan teknik pencucian menggunakan etanol atau filtrasi. Akhirnya, DNA yang telah dimurnikan dan dibersihkan dielusi dari kolom atau membran tempat ia terikat selama proses isolasi menggunakan larutan elusi (Cahyono, 2019). DNA yang diperoleh dari proses isolasi dapat digunakan untuk berbagai aplikasi dalam biologi molekuler seperti PCR, sekuensing DNA, analisis restriksi, kloning, studi genomik, dan aplikasi forensik. Proses isolasi DNA membutuhkan ketelitian dan kehati-hatian yang tinggi untuk memastikan bahwa DNA yang dihasilkan adalah murni, tidak terkontaminasi, dan berkualitas tinggi. Variasi dalam teknik isolasi DNA dapat terjadi tergantung pada sifat sampel dan aplikasi yang diinginkan. Sebagai hasilnya, penting untuk memilih metode isolasi yang sesuai dengan kebutuhan eksperimen dan memperhatikan faktor-faktor seperti jenis sampel, ukuran DNA yang diinginkan, dan kemungkinan adanya kontaminasi atau inhibitor dalam sampel.

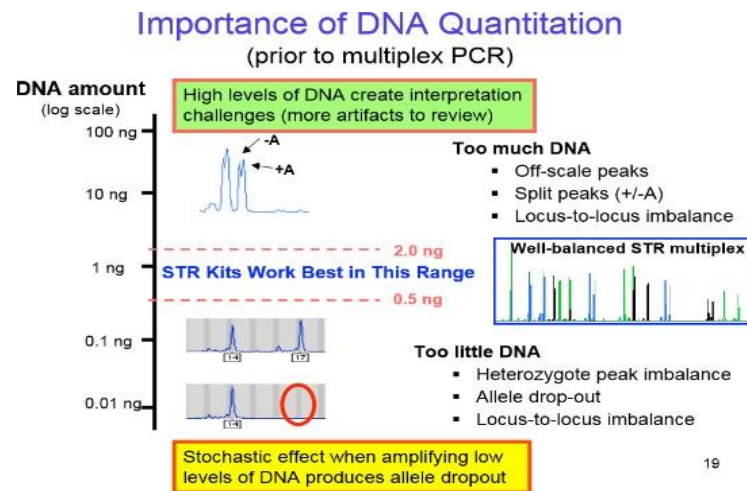


Gambar 3. Langkah-langkah Isolasi DNA (Cahyono, 2019)

Proses isolasi DNA membutuhkan ketelitian dan kehati-hatian yang tinggi untuk memastikan bahwa DNA yang dihasilkan adalah murni, tidak terkontaminasi, dan berkualitas tinggi. Variasi dalam teknik isolasi DNA dapat terjadi tergantung pada sifat sampel dan aplikasi yang diinginkan. Sebagai hasilnya, penting untuk memilih metode isolasi yang sesuai dengan kebutuhan eksperimen dan memperhatikan faktor-faktor seperti jenis sampel, ukuran DNA yang diinginkan, dan kemungkinan adanya kontaminasi atau inhibitor dalam sampel.

2.1.5.2 Kuantifikasi DNA

Dalam pemeriksaan DNA diharapkan jumlah DNA yang tidak terlalu kecil atau jumlah DNA yang terlalu banyak. DNA yang terlalu banyak dapat menyebabkan kesulitan saat interpretasi dan memakan waktu yang lebih lama, sedangkan DNA yang terlalu sedikit dapat mengakibatkan hilangnya alel-alel yang diperlukan untuk identifikasi DNA. Jumlah DNA yang dikehendaki untuk PCR adalah antara 0,5 ng – 2,0 ng.



Gambar 4. Kuantitas DNA untuk PCR (Butler, 2006)

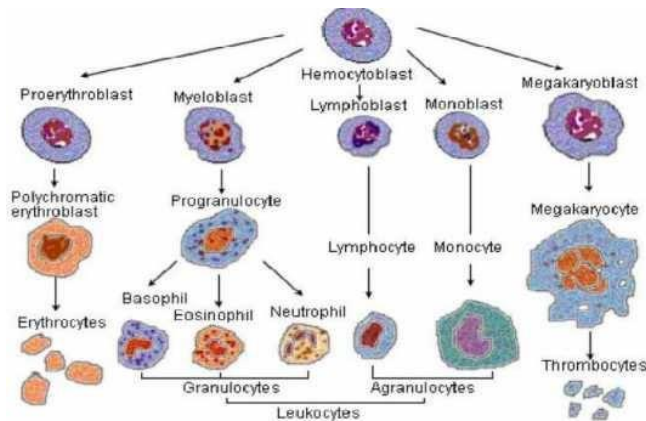
2.2 Darah

Darah disusun oleh dua komponen utama yaitu komponen cairan atau plasma dan komponen seluler. Sel darah terdiri atas eritrosit, trombosit dan leukosit (Gambar 2.1). Komponen seluler ini meliputi bagian yang besarnya 30 sampai 45% dari volume darah keseluruhan. Frandson(1981) menyatakan volume plasma darah mencapai 55% dari bagian darah, volume plasma darah mencapai 55 sampai 70% dari bagian darah keseluruhan. Plasma darah tersusun atas 92% air dan 8% substansi lain. Substansi ini terdiri dari 90% protein, 0,8% material organik non protein dan sisanya material anorganik. Protein plasma darah terdiri atas dua tipe yaitu albumin dan globulin (Frandsen, 1981).

Jumlah eritrosit atau sel darah merah pada ayam jantan adalah sebesar 320 juta sampai 380 juta permililiter darah, sedangkan untuk ayam betina sebesar 300 juta permililiter darah. Rentang hidup eritrosit adalah 28 sampai 30 hari. Jumlah eritrosit di dalam tubuh akan dipertahankan dalam jumlah yang tetap. Keadaan ini dapat tercapai karena adanya produksi eritrosit harian yang sebanding dengan eritrosit yang mati setiap harinya (Schalm dan Carol, 1975). Sel darah merah lebih berat dari sel darah putih, dan kedua jenis sel itu lebih berat dibandingkan plasma (Wardhani, 2008).

Sel darah putih sangat berbeda dengan sel darah merah. Sel darah putih memiliki bentuk yang khas terdiri dari nukleus, sitoplasma, organel dan bersifat mampu bergerak pada keadaan tertentu. Sedangkan sel darah merah tidak berinti,

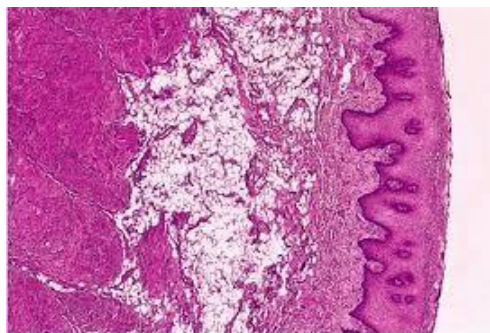
berbentuk cawan bikonkaf dan bersifat pasif. Dua bentuk leukosit yang berbeda yaitu, granulosit yang memiliki butir khas dan jelas dalam sitoplasma dan agranulosit yang tidak memiliki butir khas dalam sitoplasma. Termasuk dalam bentuk granulosit diantaranya neutrofil, eosinofil, dan basofil. Sebaliknya yang termasuk agranulosit diantaranya monosit dan limfosit (Frandsen, 1992).



Gambar 5. Sel darah (Sciencebooth, 2014)

2.3 Buccal Swab

Secara histologis mukosa mulut terdiri dari 2 lapisan. Yang pertama adalah lapisan epitelium, yang melapisi di bagian permukaan luar, terdiri dari berlapis-lapis sel mati yang berbentuk pipih dimana lapisan sel-sel yang mati ini selalu diganti terus-menerus dari bawah, dan sel-sel ini disebut dengan *stratified squamous epithelium*. Struktur epitel rongga mulut dari arah luar ke dalam adalah stratum keratinosum, stratum granulosum, stratum spinosum, stratum basalis. Yang kedua adalah lamina propria ini terdapat ujung-ujung saraf rasa sakit, raba, suhu dan cita rasa (Avery & Chiego, 2006; Balogh & Fehrenbach, 2006).



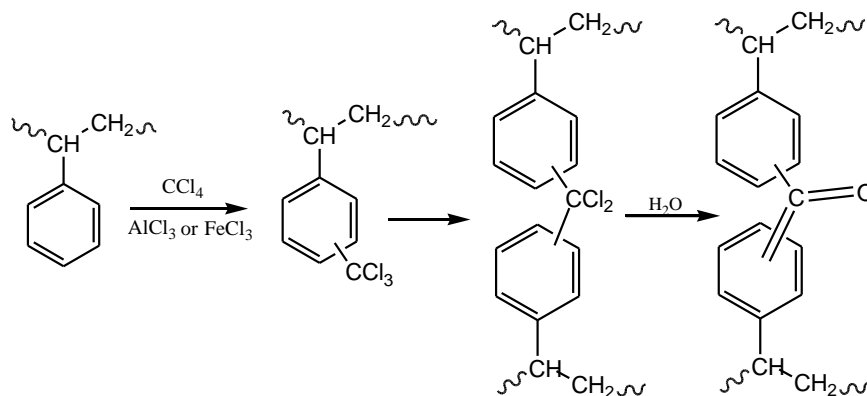
Gambar 6. Mukosa Buccal (Pathologyoutlines, 2021)

Pengambilan sampel dari mukosa mulut bisa menggunakan teknik buccal swab. Targetnya adalah sel epitel pipih berlapis (*squamous epithelial cells*) yang bisa diperoleh dari mukosa di bukal, namun biasanya ada sejumlah saliva yang juga terambil.

Hal ini dikarenakan mukosa mulut yang selalu mengalami perombakan (*turn over*) dengan *turn over rate* 14 hari sehingga secara alamiah memang mengalami pengelupasan (*exfoliation*) dengan *exfoliation rate* 2-4 jam.

2.4 Metode Resin

Pada metode resin dengan menggunakan resin *Chelex* adalah bahan *chelating* dari Bio-Rad yang digunakan untuk memurnikan senyawa lain melalui pertukaran ion. Kemampuannya untuk mengikat ion logam transisi. Ini adalah *styrene-divinylbenzene co-polymer* yang mengandung gugus asam iminodiasetat. Larutan logam pekat diperoleh dengan mengencerkan resin dengan volume kecil asam nitrat 2 M, yang memprotonasi gugus iminodiasetat. Resin *chelex* sering digunakan untuk ekstraksi DNA dalam persiapan untuk reaksi berantai polimerase dengan mengikat kation termasuk Mg^{2+} , yang merupakan kofaktor penting untuk DNase. Resin *Chelex* melindungi sampel dari DNase yang mungkin tetap aktif setelah mendidih dan kemudian dapat menurunkan DNA, membuatnya tidak cocok untuk PCR. Setelah mendidih, preparat resin *Chelex*-DNA stabil dan dapat disimpan pada suhu $4^{\circ}C$ selama 3-4 bulan. Resin polar mengikat komponen seluler polar setelah memecah sel terbuka, sementara DNA dan RNA tetap dalam larutan air di atas resin *Chelex*. Namun, langkah-langkah pemanasan melakukan denaturasi heliks ganda, dan DNA untai tunggal yang dihasilkan kurang stabil dalam penyimpanan (Marwayana, 2015).



Gambar 7. Struktur Kimia Resin *Chelex*

2.5 Metode Lisis

Metode lisis dengan menggunakan kit yang telah dikembangkan untuk ekstraksi DNA dari jaringan terkalsifikasi (tulang, gigi), serta sampel yang mengandung perekat tertentu seperti puntung rokok, selotip, dan penutup amplop. Kit ini memungkinkan hasil dan kemurnian DNA yang sebanding atau lebih baik daripada metode berbasis fenol-kloroform konvensional, dengan perkiraan waktu pemrosesan hanya 2 hingga 3 jam.

Dioptimalkan untuk digunakan dengan tulang dan gigi, serta sampel yang mengandung perekat lainnya, dan memungkinkan memperoleh hasil dan kemurnian DNA yang sebanding atau lebih baik daripada metode berbasis fenol-kloroform konvensional :

1. Memungkinkan pemindahan tabung yang lebih sedikit dan kemudahan penggunaan secara keseluruhan yang lebih besar daripada metode konvensional, sehingga meminimalkan kemungkinan tercampurnya sampel atau kontaminasi.
2. Menggunakan protokol yang sederhana dan kuat yang memfasilitasi kemudahan penerapan dan pelatihan, dan lebih “toleran” terhadap berbagai tingkat pengalaman.
3. Secara signifikan mengurangi waktu pemrosesan untuk tulang dan gigi dengan membutuhkan waktu lisis yang lebih pendek (sekitar 2 jam) dibandingkan dengan metode standar berbasis fenol-kloroform (sekitar 18-48 jam).

2.6 Real Time PCR

Kuantifikasi PCR adalah proses untuk mengetahui kuantitas dan kualitas DNA yang telah diekstraksi. Perbedaan qPCR atau Real-Time PCR dengan PCR adalah, PCR berfungsi untuk mendeteksi dan mengamplifikasi salinan sampel DNA spesifik, sedangkan Real-Time PCR mendeteksi dan mengamplifikasi molekul DNA spesifik dengan menggunakan *probe* yang dilabeli dengan *reporter fluorescence* sehingga memungkinkan terjadinya amplifikasi lebih dari satu fragmen DNA dalam waktu yang bersamaan. Proses kuantifikasi DNA dapat dilakukan menggunakan qPCR yang mampu menyediakan penilaian kualitas

terhadap kandungan dan kemurnian DNA serta kuantitas DNA untuk proses amplifikasi (Butler, 2015).

Kuantifikasi DNA memainkan peran sentral pada semua bidang dan analisis DNA forensik. Kuantifikasi DNA menjadi penting pada dunia forensik karena jumlah sampel yang jumlahnya terbatas. Kuantifikasi DNA menggunakan qPCR bergantung pada produk yang diperkuat atau amplicon pada tiap siklus PCR. Deteksi produk PCR dilakukan menggunakan instrumen *thermal cycler* yang mampu mengukur perubahan fluoresensi hasil amplicon. Berbagai macam fluorescence telah dikembangkan untuk aplikasi qPCR, saat ini yang banyak digunakan dalam pengujian deteksi amplicon adalah SYBR™ Green dan TaqMan™. Metode SYBR™ Green mengandalkan besar sinyal fluoresensi saat pewarna terikat pada untai ganda DNA, biasanya diterapkan pada metode sederhana seperti kuantifikasi *singleplex*. Metode TaqMan™ merupakan metode yang sulit dirancang dan dikembangkan namun menghasilkan hasil pengujian yang lebih spesifik. TaqMan™ menggunakan *probe* dengan label yang berbeda untuk urutan target yang berbeda pula, sehingga memungkinkan untuk melakukan kuantifikasi *multiplex* dua atau lebih sampel yang berbeda dalam satu tabung (Timken, 2002). *Probe* merupakan primer oligonukleotida atau fragmen kecil DNA atau RNA yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan urutan target dalam sampel DNA atau RNA, sehingga qPCR memiliki kemampuan dalam membaca konsentrasi, inhibitor, dan tingkat ekspresi DNA menggunakan pendaran cahaya (Butler, 2015).

Real-time PCR, juga dikenal sebagai PCR kuantitatif atau qPCR, telah menjadi salah satu alat utama dalam penelitian biologi molekuler dan diagnostik molekuler. Metode ini memungkinkan pengukuran jumlah produk amplifikasi secara langsung saat reaksi berlangsung, berbeda dengan PCR konvensional yang mengharuskan analisis produk amplifikasi setelah reaksi selesai. Prinsip dasar real-time PCR melibatkan deteksi sinyal fluoresensi yang terkait dengan peningkatan jumlah DNA target selama setiap siklus amplifikasi. Ini biasanya dilakukan dengan menggunakan fluorophore yang terikat pada probe spesifik atau dye DNA-interkalasi. Penggunaan fluoresensi memungkinkan pengukuran secara kuantitatif dan sensitif dari jumlah awal target gen dalam sampel. Platform real-time PCR bervariasi, tetapi umumnya melibatkan instrumen yang dilengkapi dengan detektor

fluoresensi yang dapat merekam dan menganalisis sinyal pada setiap siklus amplifikasi (Sambrook, 1989).

2.7 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) telah menjadi salah satu alat paling kuat dalam biologi molekuler sejak diperkenalkan pada awal 1980-an oleh Kary Mullis. Dengan kemampuannya untuk mengamplifikasi secara selektif fragmen DNA secara eksponensial, PCR telah mendukung kemajuan signifikan dalam berbagai bidang, termasuk diagnostik medis, penelitian genetika, forensik, dan pertanian. Dalam bab ini, kami akan membahas prinsip dasar, variasi, aplikasi, serta tantangan dan kemajuan terkini dalam teknologi PCR.

PCR memanfaatkan enzim DNA polimerase untuk mengamplifikasi fragmen DNA target secara eksponensial melalui serangkaian tahapan. Denaturasi pertama terjadi pada suhu tinggi, memisahkan dua untai DNA. Kemudian, primer pendek berikatan dengan ujung 5' dari fragmen target, diikuti oleh elongasi oleh DNA polimerase, yang menambahkan nukleotida baru ke ujung 3' primer, memperpanjang untai baru DNA (Maguire, 2013).

PCR melibatkan beberapa komponen penting, termasuk DNA Template Sekuen DNA yang ingin diperbanyak, primer: Oligonukleotida pendek yang berikatan dengan ujung 5' dan 3' dari fragmen target, nukleotida adalah monomer yang membentuk struktur dasar DNA, enzim DNA polimerase yang bertanggung jawab atas pembentukan ikatan fosfodiester antara nukleotida. PCR memiliki beragam aplikasi dalam berbagai bidang seperti diagnostik medis sebagai Deteksi penyakit menular, identifikasi penyakit genetik, dan pemantauan terapi serta penelitian genetika seperti studi polimorfisme genetik, sekuensing DNA, dan analisis ekspresi gen dan juga pada forensik seperti identifikasi individu, pemecahan kejahatan, dan identifikasi sumber DNA. Tantangan seperti kontaminasi silang dan amplifikasi nonspesifik terus diatasi melalui pengembangan enzim DNA polimerase yang lebih tahan panas dan teknologi deteksi yang lebih sensitif. Selain itu, kemajuan dalam desain primer dan optimasi protokol PCR telah meningkatkan spesifisitas dan sensitivitas reaksi. PCR tetap menjadi alat yang sangat penting dalam penelitian biologi molekuler dan memiliki dampak yang besar

dalam berbagai bidang aplikasi. Dengan terus berkembangnya teknologi dan metodologi terkait, PCR akan terus menjadi penunjang utama dalam penelitian dan aplikasi biologi molekuler di masa depan.

2.8 Analisis Fragmen DNA

Analisis fragmen DNA merupakan salah satu teknik penting dalam bidang genetika molekuler yang digunakan untuk mempelajari variasi genetik antar individu. Teknik ini sering diaplikasikan dalam berbagai bidang, seperti forensik, penelitian genetik, dan diagnosa penyakit genetik. Dalam konteks analisis fragmen DNA dari sampel darah dan buccal swab, alat yang sering digunakan adalah *genetic analyzer*.

Sampel darah dan buccal swab merupakan sumber DNA yang umum digunakan karena relatif mudah diperoleh dan mengandung jumlah DNA yang cukup untuk dianalisis. Proses analisis dimulai dengan isolasi DNA dari sampel-sampel. DNA yang telah diisolasi kemudian melalui proses amplifikasi menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk memperbanyak segmen-segmen DNA yang relevan.

Setelah proses PCR, produk DNA kemudian dianalisis menggunakan *genetic analyzer*. Alat ini bekerja dengan prinsip elektroforesis kapiler, di mana molekul-molekul DNA dipisahkan berdasarkan ukuran fragmennya saat melewati kapiler yang terisi gel. Fragmen-fragmen DNA yang lebih kecil akan bergerak lebih cepat dibandingkan fragmen yang lebih besar, memungkinkan pemisahan yang akurat. *Genetic analyzer* dilengkapi dengan detektor fluoresensi yang mampu mendeteksi dan mengukur panjang fragmen DNA dengan presisi tinggi (Weston *et al.*, 1992).

Data yang diperoleh dari *genetic analyzer* biasanya berupa elektrofrogram, yang menampilkan puncak-puncak fluoresensi yang merepresentasikan fragmen-fragmen DNA. Analisis lebih lanjut terhadap data ini memungkinkan identifikasi dan karakterisasi variasi genetik dalam sampel. Misalnya, dalam studi forensik, pola fragmen DNA yang unik dapat digunakan untuk mengidentifikasi individu, sementara dalam penelitian penyakit genetik, variasi dalam ukuran fragmen dapat mengindikasikan adanya mutasi atau kelainan genetik.

Keandalan dan akurasi alat *genetic analyzer* menjadikannya pilihan utama dalam analisis fragmen DNA. Kemampuan alat ini untuk memberikan hasil yang cepat dan akurat sangat penting dalam berbagai aplikasi, mulai dari investigasi kriminal hingga penelitian medis. Oleh karena itu, pemahaman mendalam tentang prinsip kerja dan aplikasi *genetic analyzer* merupakan hal yang esensial bagi siapa pun yang terlibat dalam penelitian genetika molekuler.

BAB III

BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Human, Pusat Laboratorium Forensik, Badan Reserse Kriminal, Kepolisian Republik Indonesia. Penelitian ini berlangsung pada bulan Mei 2024 sampai Juni 2024.

3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung mikro, *microtip*, *Nuclease Free Water (NFW)*, resin *Chelex*, kit lisis, isopropanol, DL-Dithiothreitol (DTT) dan Proteinase K, *Quantifiler™ Trio PCR Reaction Mix*.

3.3 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bio-Safety-Cabinet* (BSC), pinset, gunting, mikropipet, *thermomixer*, *mini centrifuge*, *vortex*, *waterbath*, *magnetic stand*, *Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR*, *GeneAmp® PCR 9700 Thermal Cycler*, dan *Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer*.

3.4 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: (1) preparasi sampel (2) ekstraksi DNA dengan metode resin, (3) isolasi DNA dengan metode lisis, (4) isolasi DNA dengan modifikasi metode resin dan lisis dan (5) kuantifikasi DNA hasil isolasi sampel darah dan *buccal swab* dengan metode ekstraksi resin, metode ekstraksi lisis dan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis dengan menggunakan *Real Time PCR*.

3.4.1 Preparasi Sampel

Sampel darah diambil menggunakan lancet accu chek di bagian jari tangan dan darah yang sudah keluar di teteskan pada kain kasa dan *buccal swab* diambil menggunakan cotton swab pada mulut bagian dalam dengan cara memutar satu arah.

Preparasi sampel dilakukan dengan memberikan label ID pada tabung berukuran 1,5 mL yang akan diisi dengan sampel. Sepuluh sampel darah kering pada kasa dipotong dengan ukuran $\pm 3 \text{ mm}^2$ dan sepuluh sampel *buccal swab* pada *cotton swab* dipotong pada batas potongan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang sebelumnya telah diberi label nama. Setelah itu, sampel diletakkan di atas rak tabung *ependorf* untuk diekstraksi.

3.4.2 Ekstraksi DNA dengan Metode Resin

Pada metode ekstraksi DNA dengan metode resin yaitu menggunakan resin *Chelex* dengan menggunakan sebanyak sepuluh sampel darah dan sepuluh sampel *buccal swab*. Prinsip dari metode ekstraksi resin adalah berdasarkan pertukaran ion (*ion exchange*) dimana ion Mg^{2+} akan diikat oleh resin *Chelex*. Resin *Chelex* 20% dibuat dengan menggunakan 20 gram resin *Chelex* yang dilarutkan dalam 100 mL aquades. Sampel dimasukkan pada tabung mikro 1,5mL kemudian penambahan NFW (*Nuclease Free Water*) sebanyak 1000 μL yang berfungsi sebagai pelarut yang dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Setelah itu diinkubasi dengan menggunakan *thermomixer* selama 30 menit pada suhu 37°C kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 5 detik. Dilakukan sentrifugasi pada 15.000 rpm selama 3 menit untuk mengendapkan seluruh larutan yang menempel di dinding yang kemudian dibuang supernatan hingga tersisa 30 μL . Penambahan 200 μL *Chelex* 20% yang bertujuan untuk mengikat ion Mg^{2+} yang bertindak sebagai sisi aktif enzim DNase, dilakukan dengan memotong ujung tip mikro pipet agar resin dapat ikut terambil kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 10-30 detik yang dilanjutkan dengan inkubasi di *thermomixer* selama 30 menit pada suhu 56°C.

Setelah diinkubasi, dilakukan homogenisasi dengan menggunakan *vortex* selama 10 detik. Setelah homogen, larutan diinkubasi dalam *waterbath* pada 100°C selama 8 menit yang bertujuan untuk melisis membran sel, menghancurkan sel protein, dan mendenaturasi DNA menjadi *single strain* kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 10 detik dan diendapkan dengan sentrifugasi pada 15.000 rpm selama 3 menit untuk memisahkan resin dengan DNA yang telah terpisah. DNA akan terdapat pada supernatan sedangkan resin yang mengikat ion

Mg²⁺ akan terendapkan di dasar tabung. Supernatan kemudian dipindahkan ke tabung mikro yang baru dan disimpan pada suhu 4°C.

3.4.3 Isolasi DNA dengan Metode Ekstraksi Lisis

Pada metode isolasi DNA dengan metode ekstraksi lisis yang menggunakan kit lisis dengan menggunakan sebanyak sepuluh sampel darah dan sepuluh sampel *buccal swab*. Ekstraksi diawali dengan tahapan lisis yaitu dengan penambahan lisis bufer sebanyak 220µL, Proteinase K sebanyak 3µL, dan Dithiothreitol (DTT) sebanyak 3µL. Sampel dihomogenkan menggunakan *vortex* dan dilakukan *spindown* menggunakan *mini centrifuge*. Sampel diinkubasi pada suhu 56°C dengan kecepatan 900 rpm menggunakan *thermomixer*. Setelah itu, sampel didinginkan hingga suhu ruang dan dapat dipindahkan ke dalam *filter column* baik cairannya maupun substratnya. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 3 menit dan dipindahkan ke dalam tabung baru.

Pada tahapan *bounding magnet* dilakukan penambahan *magnetic* (magnetit) sebanyak 15µL dan isopropanol sebanyak 150µL. Sampel dapat diinkubasi pada suhu 20°C dengan kecepatan 700 rpm selama 10 menit. Sampel dihomogenkan menggunakan *vortex* dan diletakkan pada *magnetic stand*, setelah magnet pada sampel melekat pada *magnetic stand* maka dapat dibuang cairan sampel secara menyeluruh. Tahapan pencucian pada sampel DNA yang dilakukan secara bertahap sebanyak 3 kali dengan menggunakan *wash buffer A* (Tris HCl) 600µL, *wash buffer A* (Tris HCl) 300µL, dan *wash buffer B* (Tris HCl dan SDS) 300µL. Tahapan elusi dimana sampel dimasukkan elusi bufer (Tris HCl dan EDTA) sebanyak 50µL dan dihomogenkan, dan diletakkan pada *thermomixer* bersuhu 70°C dengan kecepatan 900 rpm selama 10 menit. Sampel kembali dihomogenkan dan diletakkan pada *magnetic stand* selama 5 menit. Setelah magnet menempel pada dinding tabung, seluruh cairan yang terdapat pada tabung dipindahkan ke tabung mikro 1,5mL yang baru dan kemudian disimpan pada suhu 4°C.

3.4.4 Isolasi DNA dengan Modifikasi Metode Ekstraksi Resin dan Lisis

Pada metode isolasi DNA dengan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis menggunakan sebanyak sepuluh sampel darah dan sepuluh sampel *buccal swab* adalah salah satu metode ekstraksi fasa padat yang menggunakan partikel magnetik untuk memisahkan DNA dari kontaminan seperti protein. Pemberian partikel

magnetik adalah proses purifikasi DNA, yaitu untuk memisahkan DNA dari kontaminan yang terdapat pada sampel. Pada ekstraksi ini, sampel dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL kemudian penambahan NFW (*Nuclease Free Water*) sebanyak 1000 μ L yang berfungsi sebagai pelarut yang kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Setelah itu diinkubasi dengan menggunakan *thermomixer* selama 30 menit pada suhu 37°C kemudian dihomogenisasi dengan menggunakan *vortex* selama 5 detik. Dilakukan sentrifugasi pada 15.000 rpm selama 3 menit untuk mengendapkan seluruh larutan yang menempel di dinding yang kemudian dibuang supernatan hingga tersisa 30 μ L. Penambahan 200 μ L *Chelex* 20% yang bertujuan untuk mengikat ion Mg²⁺ yang bertindak sebagai sisi aktif enzim DNase, dilakukan dengan memotong ujung tip mikropipet agar resin dapat ikut terambil kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 10-30 detik yang dilanjutkan dengan inkubasi di *thermomixer* selama 30 menit pada suhu 56°C.

Setelah diinkubasi, dilakukan homogenisasi dengan menggunakan *vortex* selama 10 detik. Setelah homogen, larutan diinkubasi dalam *waterbath* pada 100°C selama 8 menit yang bertujuan untuk melisis membran sel, menghancurkan sel protein, dan mendenaturasi DNA menjadi *single strain* kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 10 detik dan diendapkan dengan sentrifugasi pada 15.000 rpm selama 3 menit untuk memisahkan resin dengan DNA yang telah terpisah. DNA akan terdapat pada supernatan sedangkan resin yang mengikat ion Mg²⁺ akan terendapkan di dasar tabung. Supernatan kemudian dipindahkan ke tabung mikro yang baru dan disimpan pada suhu 4°C. DNA yang telah disimpan pada suhu 4°C kemudian dibiarkan di suhu ruangan dan diberikan 7 μ L partikel magnetik yang telah dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 5 detik. Setelah diberikan partikel magnetik (magnetit), dengan menggunakan *vortex* selama 10 detik dan di *quick spin* disentrifugasi hingga 8000 rpm kemudian penambahan 150 μ L isopropanol yang berguna untuk mengendapkan protein yang memiliki berat molekul yang lebih besar dari DNA kemudian diendapkan dengan cara sentrifugasi. Selanjutnya diinkubasi dalam *thermomixer* pada suhu ruang (37°C) dengan kecepatan 700 rpm selama 10 menit yang bertujuan untuk

memisahkan protein yang terikat pada isopropanol dengan DNA yang terikat pada partikel magnetik.

Pada sampel DNA yang terikat pada partikel magnetik akan berada pada permukaan sampel dan harus dilakukan resuspensi partikel magnetik untuk mengembalikan partikel magnetik berada pada dasar tabung. Selanjutnya dihomogenkan pada 10.000 rpm selama 10 detik kemudian tabung diletakkan pada *magnetic stand* dengan tujuan memisahkan magnet dari kontaminan, dimana partikel magnetik akan menempel pada sisi tabung dan cairan sampel yang tersisa dibuang. Setelah cairan sampel dibuang, dilakukan penambahan *wash buffer A* (Tris HCl) sebanyak 300µL yang berfungsi menghilangkan kontaminan yang masih tersisa pada tabung yang berisi partikel magnetik yang dilanjutkan dengan melepas tabung dari *magnetic stand* dan dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 15 detik dan dilakukan *quick spin* kemudian diletakkan kembali di *magnetic stand* hingga partikel magnetik mengendap dan setelah mengendap, cairan sampel dibuang. Langkah tersebut diulangi dengan penambahan *wash buffer A* (Tris HCl) 150µL dan *wash buffer B* (Tris HCl dan SDS) 150µL. Setelah penambahan *wash buffer B*, tabung disentrifugasi dan diletakkan kembali di *magnetic stand* selama 1 menit dan cairan yang tersisa dibuang dan kemudian dianginkan selama 10 menit hingga tabung benar-benar kering dengan tujuan menguapkan sisa-sisa pelarut atau kontaminan yang belum terpisah (Haddad *et al.*, 2017).

Setelah pemurnian sampel, tiap tabung dimasukkan 50µL elusi bufer (Tris HCl dan EDTA) yang kemudian dihomogenkan dengan *vortex* selama 2 detik dan dilakukan *quick spin*. Setelah homogen, tabung diletakkan pada thermomixer untuk diinkubasi pada suhu 70°C dengan kecepatan 900 rpm selama 10 menit yang bertujuan untuk memisahkan DNA dari partikel magnetik. Setelah diinkubasi, sampel kembali dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 2 detik dan dilakukan *quick spin*. Sampel yang telah homogen, diletakkan pada *magnetic stand* hingga magnet menempel dengan baik pada dinding tabung. Setelah magnet menempel pada dinding tabung, seluruh cairan yang terdapat pada tabung dipindahkan ke tabung mikro 1,5 mL yang baru dan disimpan pada suhu 4°C (McKiernan dan Danielson, 2016).

3.4.5 Kuantifikasi DNA

Pada kuantifikasi dan kemurnian hasil isolasi DNA dari ekstraksi DNA dengan metode resin, ekstraksi DNA dengan metode lisis dan ekstraksi DNA dengan modifikasi metode resin dan lisis digunakan berupa supernatan hasil isolasi yang disimpan pada suhu 4°C. DNA dikuantifikasi dengan menggunakan *Real Time PCR* menggunakan *Quantifiler™ Trio PCR Reaction Mix*, dibuat larutan standar kuantifikasi, standar 1 sampai dengan standar 8, pembuatan standar DNA dilakukan dengan pengenceran berseri terhadap DNA standar yang telah dipersiapkan kit DNA standar ini mengandung 100 ng/ µL DNA, pengenceran dilakukan berseri 8x sampai konsentrasi DNA mencapai 0,05 ng/ µL. Pengenceran standar DNA menggunakan *buffer TE-4* tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengenceran standar DNA menggunakan *buffer TE-4* (Maguire, 2013).

Konsentrasi Akhir (ng/µL)	Konsentrasi Awal (ng/µL)	Voulme Akhir (µL)	DNA Stok (µL)	Quantifiler THP (µL)	Volume DNA sisa
50	100	20	10	10	10
5	50	100	10	90	90
0,5	5	100	10	90	90
0,05	0,5	100	10	90	90
0,005	0,05	100	10	90	90

Pada tahap ini disiapkan *master mix* untuk PCR dengan komponen *Quantifiler Trio Primer Mix* 8 µL, *Quantifiler PCR Reaction Mix* 10 µL, sampel/standar/kontrol 2 µL, per tube/ well 18 µL *reagent mix*. Pada sampel yang akan di *Real Time PCR* dihomogenasi dengan menggunakan *vortex* selama 2 detik, kemudian diendapkan menggunakan *spin down*, setelah sampel siap, diendapkan menggunakan *spin down*, setelah itu dimasukkan pada alat AB 7500 *Real Time PCR* dengan program PCR *Holding Stage* : 95 °C, 2 menit *Cycling Stage* : 95 °C, 9 detik dan 60 °C, 30 detik , Number of *Cycles* = 40 (Maguire, 2013).

Setelah reaksi selesai, hasilnya dianalisis menggunakan perangkat lunak Desain dan Analisis yang disertakan dengan sistem. Perangkat lunak ini dapat diakses melalui browser web atau aplikasi desktop. Selanjutnya, data yang dihasilkan diinterpretasikan dengan melihat nilai Ct (*Cycle threshold*) untuk setiap

sampel, yang dapat digunakan untuk menghitung jumlah relatif gen target dalam setiap sampel. Langkah terakhir adalah melakukan kontrol kualitas dengan menjalankan kurva standar dan memeriksa efisiensi primer untuk memastikan keakuratan dan keandalan hasil. Data dapat disimpan dan dibagikan melalui *Thermo Fisher Cloud*, yang memungkinkan akses dari mana saja dan kolaborasi dengan orang lain.

3.4.6 Amplifikasi DNA menggunakan PCR

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Pada tahap ini diawali dengan membuat larutan *cocktail* yang terdiri dari *master mix* dan *primer set* untuk setiap sampelnya masing – masing 7,5 dan 2,5 μL . Primer yang digunakan adalah *primer STR* dengan panjang sekuen sebanyak 23 pasang nukleotida. Kemudian *cocktail* dihomogenisasi dengan menggunakan *vortex* dan dibagi ke setiap tube yang berisi 15 μL sampel masing – masing 10 μL dihomogenisasi menggunakan *vortex* dan diendapkan menggunakan *spindown*. Sampel lalu di susun pada alat *GeneAmp® PCR 9700 Thermal Cycler* dan dipilih metode yang sesuai untuk sampel. Alat akan berjalan melakukan amplifikasi sebanyak 29 siklus selama 1 jam 12 menit. Setiap siklusnya terdiri dari denaturasi selama 10 detik pada suhu 94°C, *annealing* selama 90 detik pada suhu 56°C, dan ekstensi selama 10 detik pada suhu 72°C.

3.4.7 Elektroforesis Kapiler

Hasil dari PCR kemudian dibaca menggunakan CE (*Capillary Electrophoresis*) dengan menggunakan alat *Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer* dengan *software Gene Mapper*. Pada tahap ini, sampel yang sudah diamplifikasi diberikan *master mix* yang berisi *GeneScan* 0,4 μL dan *Hi-Di* 9,6 μL , kemudian sampel dihomogenisasi dengan menggunakan *vortex* dan diletakkan pada *thermal cycler* untuk denaturasi selama 3 menit pada temperatur 95°C. Setelah itu didinginkan pada suhu -20°C selama 3 menit. Setelah itu sampel dijalankan pada alat *Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer* kemudian hasilnya akan dibaca pada *Gene Mapper*.

3.4.8 Analisis Data

Dalam metode penelitian ini, analisis data yang akan dilakukan adalah analisis kuantitatif untuk menentukan dan membandingkan kuantitas DNA dari hasil isolasi

sampel darah dan *buccal swab* antara metode ekstraksi resin dan metode ekstraksi lisis dengan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis. Faktor yang akan diuji dalam penelitian DNA ini melibatkan variasi metode dan konsentrasi DNA, dimana perbedaan metode yang mungkin memengaruhi kuantitas DNA pada sampel. Pengujian kuantitatif ini bertujuan untuk menentukan apakah terdapat perbedaan yang signifikan dalam kuantitas DNA dari hasil isolasi sampel darah dan *buccal swab* dengan metode yang berbeda. Analisis kuantitatif ini akan memberikan pemahaman yang lebih mendalam tentang metode yang lebih efektif dan efisien dari perbedaan kuantitas DNA dari hasil isolasi sampel darah dan *buccal swab* yang membantu menjawab pertanyaan penelitian yang diajukan dalam penelitian ini.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada bab ini, akan dibahas mengenai pengembangan metode modifikasi ekstraksi resin dan lisis yang digunakan untuk isolasi DNA dari sampel darah dan *buccal swab*, serta evaluasi efektivitas metode tersebut menggunakan teknologi *Real Time* PCR. Pemilihan metode ekstraksi yang tepat sangat penting dalam analisis DNA karena kualitas dan kuantitas DNA yang dihasilkan sangat mempengaruhi hasil analisis selanjutnya.

Penggunaan metode resin dan lisis dalam ekstraksi DNA telah banyak diterapkan dalam berbagai penelitian. Modifikasi pada ketiga metode tersebut untuk meningkatkan efisiensi dan kemurnian DNA yang diisolasi. Modifikasi ini diharapkan dapat mengoptimalkan proses ekstraksi, mengurangi waktu dan biaya, serta meningkatkan kualitas DNA yang diperoleh, sehingga lebih cocok untuk aplikasi dalam *Real Time* PCR.

Pembahasan ini akan dimulai dengan penjelasan rinci mengenai prosedur modifikasi yang dilakukan pada masing-masing metode ekstraksi. Hasil isolasi DNA dari sampel darah dan *buccal swab* akan dievaluasi dan dibandingkan untuk menilai efektivitas modifikasi yang telah dilakukan. Analisis DNA menggunakan *Real Time* PCR untuk mengevaluasi kuantitas dari DNA yang dihasilkan dari masing-masing metode ekstraksi. Data dari *Real Time* PCR digunakan untuk menentukan keunggulan dan kelemahan dari setiap metode yang dimodifikasi.

4.1 Hasil Kuantifikasi DNA

Jumlah DNA dari ketiga metode (metode ekstraksi resin, metode ekstraksi lisis dan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis) dapat terlihat melalui data hasil kuantifikasi DNA yang diperoleh menggunakan alat *Applied Biosystems™ 7500 Real-Time* PCR. Terdapat data yang didapatkan yaitu *T. Large Autosomal*, *T. Small Autosomal*, dan *T. IPC*. *T. Large Autosomal* adalah istilah yang digunakan dalam pengukuran kuantitas DNA untuk menunjukkan jumlah DNA yang terdeteksi dalam sampel. *T. Small Autosomal* mengacu pada kuantitas DNA dalam sampel yang terdeteksi dalam jumlah kecil. Istilah ini sering digunakan

dalam konteks pengukuran kuantitatif DNA untuk menunjukkan adanya fragmen DNA kecil dari autosom. T. IPC (*Internal Positive Control*) adalah sampel atau komponen yang ditambahkan ke dalam reaksi untuk memastikan bahwa proses pengujian berfungsi dengan baik. IPC digunakan untuk mengontrol kualitas dan validitas hasil dalam berbagai teknik pengukuran kuantitas DNA. *Degradation Index* (DI) adalah metrik yang digunakan untuk menilai tingkat degradasi DNA dalam suatu sampel.

Tabel 3. Hasil Kuantifikasi DNA Sampel Darah dengan tiga metode menggunakan *Real Time PCR*

Metode	No.	Kode Sampel Darah	<i>Quantity Mean</i> (ng/ μ L)		T. IPC	Degradation Index
			T. Large Autosomal	T. Small Autosomal		
Resin	1.	D.Cl. 1	4,314	2,511	28,549	0,583
	2.	D. Cl. 2	3,692	2,631	28,121	0,675
	3.	D. Cl. 3	3,411	2,514	28,101	0,704
	4.	D. Cl. 4	4,516	2,789	28,750	0,906
	5.	D. Cl. 5	3,330	2,224	28,440	0,901
	6.	D. Cl. 6	3,445	2,258	28,102	0,759
	7.	D. Cl. 7	4,478	2,890	28,996	0,910
	8.	D. Cl. 8	4,667	2,110	28,884	0,908
	9.	D. Cl. 9	4,747	2,568	28,789	0,829
	10.	D. Cl. 10	3,112	2,222	28,110	0,303
NILAI RATA-RATA			3,971	2,472	28,527	0,748
Lisis	1.	D. P. 1	0,168	0,189	27,653	0,928
	2.	D. P. 2	0,234	0,190	27,701	0,905
	3.	D. P. 3	0,560	0,165	27,573	0,867
	4.	D. P. 4	0,459	0,249	27,324	0,632
	5.	D. P. 5	0,568	0,458	27,885	0,798
	6.	D. P. 6	0,178	0,156	27,987	0,675
	7.	D. P. 7	0,143	0,101	27,409	0,523
	8.	D. P. 8	0,167	0,176	27,431	0,436
	9.	D. P. 9	0,129	0,111	27,311	0,232
	10.	D. P. 10	0,782	0,543	27,698	0,958
NILAI RATA-RATA			0,339	0,234	27,597	0,695
	1.	D.CP. 1	15,979	13,165	28,860	0,401

Modifikasi Resin dan Lisis	2.	D. CP. 2	14,567	12,980	28,687	0,789
	3.	D. CP. 3	12,945	9,541	28,934	0,641
	4.	D. CP. 4	14,854	10,808	28,805	0,766
	5.	D. CP. 5	13,633	7,477	28,854	0,564
	6.	D. CP. 6	12,324	10,764	28,768	0,643
	7.	D. CP. 7	14,876	13,087	28,870	0,361
	8.	D. CP. 8	12,986	6,713	28,342	0,439
	9.	D. CP. 9	13,775	7,876	28,406	0,365
	10.	D. CP. 10	13,674	11,765	28,758	0,865
	NILAI RATA-RATA			13,961	10,418	28,728

Pada hasil uji kuantitatif menggunakan sampel DNA berupa sampel darah dapat terlihat perbedaan hasil antara penggunaan metode ekstraksi resin dan metode ekstraksi lisis dengan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis yang dapat dilihat dari 30 sampel yang telah diteliti berdasarkan Tabel 3. bahwa nilai rata rata *T. Large Autosomal* dari modifikasi metode resin dan lisis lebih besar yaitu 13,961 ng/ μ L jika dibandingkan dengan *T. Large Autosomal* dari metode resin yaitu sebesar 3,971 ng/ μ L dan *T. Large Autosomal* dari metode lisis yaitu sebesar 0,339 ng/ μ L.

Nilai rata rata *T. Small Autosomal* dari modifikasi metode resin dan lisis lebih besar yaitu 10,418 ng/ μ L jika dibandingkan dengan *T. Small Autosomal* dari metode resin yaitu sebesar 2,472 ng/ μ L dan *T. Small Autosomal* dari metode lisis yaitu sebesar 0,234 ng/ μ L pada sampel darah.

Nilai rata rata *T. IPC* dari modifikasi metode resin dan lisis lebih besar yaitu 28,728 jika dibandingkan dengan *T. IPC* dari metode resin yaitu sebesar 28,527 dan *T. IPC* dari metode lisis yaitu sebesar 27,597 pada sampel darah.

Nilai rata-rata *T. Large Autosomal*, *T. Small Autosomal*, *T. IPC* pada sampel darah yang menggunakan modifikasi metode resin dan lisis jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan nilai rata-rata *T. Large Autosomal*, *T. Small Autosomal*, *T. IPC* pada sampel darah yang menggunakan metode resin dan metode lisis.

Nilai rata rata *DI* dari modifikasi metode resin dan lisis lebih rendah yaitu 0,583 jika dibandingkan dengan *DI* dari metode resin yaitu sebesar 0,748 dan *DI* dari metode lisis yaitu sebesar 0,695 pada sampel darah (Tabel 4). Menurut Lackey A (2018), nilai *Degradation Index* untuk DNA yang utuh yaitu berada pada angka

≤1. Sedangkan apabila nilai tersebut melebihi angka 1 maka dapat dikatakan bahwa sampel terindikasi degradasi. Maka semakin rendah nilai DI maka semakin bagus untuk DNA dan bisa memasuki proses selanjutnya.

Tabel 4. Hasil Kuantifikasi DNA Sampel *Buccal Swab* dengan tiga metode menggunakan *Real Time PCR*

Metode	No.	Kode Sampel <i>Buccal Swab</i>	<i>Quantity Mean</i> (ng/μL)		T. IPC	Degradation Index
			T. Large Autosomal	T. Small Autosomal		
Resin	1.	B.Cl. 1	3,332	2,282	28,549	0,713
	2.	B. Cl. 2	3,201	2,211	28,345	0,976
	3.	B. Cl. 3	3,653	2,344	28,231	0,764
	4.	B. Cl. 4	3,651	2,377	28,332	0,654
	5.	B. Cl. 5	4,098	2,003	28,101	0,995
	6.	B. Cl. 6	3,123	2,989	28,543	0,776
	7.	B. Cl. 7	3,410	2,892	28,643	0,876
	8.	B. Cl. 8	4,001	2,998	28,999	0,991
	9.	B. Cl. 9	3,516	2,501	28,406	0,812
	10.	B Cl. 10	3,450	2,537	28,217	0,315
NILAI RATA-RATA			3,544	2,513	28,437	0,787
Lisis	1.	B. P. 1	0,150	0,189	27,737	0,928
	2.	B. P. 2	0,156	0,187	27,657	0,734
	3.	B. P. 3	0,176	0,156	27,735	0,752
	4.	B. P. 4	1,001	0,986	27,998	0,711
	5.	B. P. 5	0,514	0,312	27,205	0,489
	6.	B. P. 6	0,211	0,113	27,432	0,754
	7.	B. P. 7	0,347	0,390	27,409	0,764
	8.	B. P. 8	0,879	0,543	27,319	0,911
	9.	B. P. 9	0,546	0,449	27,463	0,685
	10.	B. P. 10	0,878	0,766	27,659	0,643
NILAI RATA-RATA			0,486	0,409	27,561	0,737
Modifikasi Resin dan Lisis	1.	B.CP. 1	27,346	18,519	29,824	0,760
	2.	B. CP. 2	20,896	15,795	28,652	0,955
	3.	B. CP. 3	25,876	13,908	28,879	0,984
	4.	B. CP. 4	27,867	16,980	28,865	0,989
	5.	B. CP. 5	27,657	17,895	28,997	0,508
	6.	B. CP. 6	18,675	16,865	28,765	0,778

	7.	B. CP. 7	20,766	15,065	28,987	0,567
	8.	B. CP. 8	26,892	18,765	28,999	0,451
	9.	B. CP. 9	22,876	18,123	28,694	0,478
	10.	B CP. 10	22,679	15,088	28,867	0,615
NILAI RATA-RATA			24,153	16,700	28,953	0,709

Pada hasil uji kuantitatif yang tertera pada Tabel. 4 menggunakan sampel DNA berupa *buccal swab* dapat terlihat perbedaan hasil antara penggunaan metode ekstraksi resin dan metode ekstraksi lisis dengan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis yang dapat dilihat dari 30 sampel yang telah diteliti berdasarkan Tabel 4. bahwa nilai rata rata *T. Large Autosomal* dari modifikasi metode resin dan lisis lebih besar yaitu 24,153 ng/ μ L jika dibandingkan dengan *T. Large Autosomal* dari metode resin yaitu sebesar 3,544 ng/ μ L dan *T. Large Autosomal* dari metode lisis yaitu sebesar 0,486 ng/ μ L.

Nilai rata rata *T. Small Autosomal* dari modifikasi metode resin dan lisis lebih besar yaitu 16,700 ng/ μ L jika dibandingkan dengan *T. Small Autosomal* dari metode resin yaitu sebesar 2,513 ng/ μ L dan *T. Small Autosomal* dari metode lisis yaitu sebesar 0,409 ng/ μ L pada *buccal swab*.

Nilai rata rata *T. IPC* dari modifikasi metode resin dan lisis lebih besar yaitu 28,728 jika dibandingkan dengan *T. IPC* dari metode resin yaitu sebesar 28,437 dan *T. IPC* dari metode lisis yaitu sebesar 28,953 pada *buccal swab*.

Nilai rata-rata *T. Large Autosomal*, *T. Small Autosomal*, *T. IPC* pada *buccal swab* yang menggunakan modifikasi metode resin dan lisis jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan nilai rata-rata *T. Large Autosomal*, *T. Small Autosomal*, *T. IPC* pada *buccal swab* yang menggunakan metode resin dan metode lisis.

Nilai rata rata *DI* dari modifikasi metode resin dan lisis lebih rendah yaitu 0,709 jika dibandingkan dengan *DI* dari metode resin yaitu sebesar 0,787 dan *DI* dari metode lisis yaitu sebesar 0,737 pada sampel darah dan *buccal swab* (Tabel 4). Menurut Lackey A (2018), nilai *Degradation Index* untuk DNA yang utuh yaitu berada pada angka ≤ 1 . Sedangkan apabila nilai tersebut melebihi angka 1 maka dapat dikatakan bahwa sampel terindikasi degradasi. Maka semakin rendah nilai *DI* maka semakin bagus untuk DNA dan bisa memasuki proses selanjutnya.

Data pada Tabel 3 dan Tabel 4 kemudian di analisis menggunakan analisis ragam ANOVA, untuk mengetahui perbedaan signifikan dari metode ekstraksi resin, metode ekstraksi lisis dan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis .

Berdasarkan hasil uji Anova pada *T. Large Autosomal* F hitung faktor pada metode, faktor sampel dan interaksi keduanya antara metode dan sampel lebih besar dari F tabel 1% sehingga faktor metode, faktor sampel dan interaksi antara metode dan sampel berbeda sangat nyata, karena berbeda nyata maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji duncan dengan hasil faktor metode memiliki notasi yang berbeda satu dengan yang lain sehingga metode resin, metode lisis dan modifikasi metode resin dan lisis berbeda nyata satu dengan yang lain. Dilihat dari rata-rata, faktor dengan rata-rata tertinggi yaitu metode modifikasi resin dan lisis dan berbeda nyata dengan metode resin dan metode lisis sehingga dilihat dari faktor metode, metode modifikasi resin dan lisis adalah metode terbaik.

Tabel 5. Hasil uji duncan interaksi ketiga metode

Faktor B (Sampel)	Faktor A (Metode)			Rata-rata Faktor B
	Resin (A1)	Lisis (A2)	Modifikasi Resin dan Lisis (A3)	
Darah (B1)	3,97 ± 0,63 ^b	0,34 ± 0,23 ^a	13,96 ± 1,10 ^c	6,09 ± 5,90 ^A
Buccal Swab (B2)	3,54 ± 0,32 ^b	0,49 ± 0,33 ^a	24,15 ± 3,38 ^d	9,39 ± 10,86 ^B
Rata-rata Faktor A	3,76 ± 0,53 ^B	0,41 ± 0,29 ^A	19,06 ± 5,77 ^C	

Keterangan:

- Seluruh data disajikan dalam rata-rata ± standar deviasi.
- Data dengan simbol *superscript* yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,005$) dengan menggunakan uji Duncan.

Hasil uji duncan interaksi modifikasi resin dan lisis sampel *buccal swab* memiliki rata-rata tertinggi dan berbeda nyata dengan seluruh perlakuan yang lainnya sehingga metode modifikasi resin dan lisis sampel *buccal swab* merupakan perlakuan terbaik dilihat dari interaksi perlakuan yang tertera pada Tabel 5. Data lengkap tertera pada Lampiran 2a.

Berdasarkan hasil uji Anova pada *T. Small Autosomal* F hitung faktor pada metode, faktor sampel dan interaksi keduanya antara metode dan sampel lebih besar

dari F tabel 1% sehingga faktor metode, faktor sampel dan interaksi antara metode dan sampel berbeda sangat nyata, karena berbeda nyata maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji duncan dengan hasil faktor metode memiliki notasi yang berbeda satu dengan yang lain sehingga metode resin, metode lisis dan modifikasi metode resin dan lisis berbeda nyata satu dengan yang lain. Dilihat dari rata-rata, faktor dengan rata-rata tertinggi yaitu metode modifikasi resin dan lisis dan berbeda nyata dengan metode lisis dan metode resin sehingga dilihat dari faktor metode, metode modifikasi resin dan lisis adalah metode terbaik.

Hasil uji duncan interaksi modifikasi resin dan lisis sampel *buccal swab* memiliki rata-rata tertinggi dan berbeda nyata dengan seluruh perlakuan yang lainnya sehingga metode modifikasi resin dan lisis sampel *buccal swab* merupakan perlakuan terbaik dilihat dari interaksi perlakuan. Data lengkap tertera pada Lampiran 2b.

Hasil uji anova pada T. IPC bahwa F hitung faktor metode, faktor sampel dan interaksi keduanya antara metode dan sampel lebih kecil dari F tabel 5% sehingga faktor metode, faktor sampel dan interaksi keduanya antara metode dan sampel tidak berbeda nyata. Karena tidak berbeda nyata maka tidak dilakukan uji lanjut dan disimpulkan bahwa T.IPC dilihat dari metode, sampel dan interaksi keduanya semuanya sama (tidak berbeda nyata) sehingga untuk parameter T. IPC tidak ada perlakuan terbaik. Data lengkap tertera pada Lampiran 2c.

Berdasarkan hasil uji anova pada *Degradation Index* bahwa F hitung faktor metode, faktor sampel dan interaksi keduanya antara metode dan sampel lebih kecil dari F tabel 5% sehingga faktor metode, faktor sampel dan interaksi keduanya antara metode dan sampel tidak berbeda nyata. Karena tidak berbeda nyata maka tidak dilakukan uji lanjut dan disimpulkan bahwa *Degradation Index* dilihat dari metode, sampel dan interaksi keduanya semuanya sama (tidak berbeda nyata) sehingga untuk parameter *Degradation Index* tidak ada perlakuan terbaik. Data lengkap tertera pada Lampiran 2d.

Tabel 6. Mekanisme Ketiga Metode Ekstraksi

Resin		Lisis		Modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis	
+ Resin <i>Chelex</i>	untuk menghilangkan ion logam divalen seperti Mg^{2+} dan Ca^{2+} dari sampel biologis.	+ Lisis Buffer (SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)),	detergen anionik yang efektif dalam menghancurkan membran sel dengan mengikat ke lipid membran dan mengganggu strukturnya	+ Resin <i>Chelex</i>	untuk menghilangkan ion logam divalen seperti Mg^{2+} dan Ca^{2+} dari sampel biologis.
Inkubasi 37° C 30 menit	sel-sel dalam sampel akan pecah dan melepaskan isi seluler, termasuk DNA.	Proteinase K	Enzim proteolitik untuk lisis protein tambahan setelah lisis sel.	Inkubasi 37° C 30 menit	sel-sel dalam sampel akan pecah dan melepaskan isi seluler, termasuk DNA.
Inkubasi 100° C 8 menit	pelepasan DNA dari nukleus dan organel lain dalam sel	<i>Dithiothreitol</i> (DTT)	memecah ikatan disulfida dalam protein sel-sel darah	Inkubasi 100° C 8 menit	pelepasan DNA dari nukleus dan organel lain dalam sel
		Inkubasi 56° C 40 menit	sel-sel dalam sampel akan pecah dan melepaskan isi seluler, termasuk DNA.	Bounding Magnet (Magnetic Particles (magnetit, Fe_3O_4) dan Isopropanol	magnetit (Fe_3O_4) untuk menangkap asam nukleat dari sampel biologis dan isopropanol untuk memisahkan dan mengendapkan DNA

		Bounding Magnet (Magnetic Particles (magnetit, Fe ₃ O ₄) dan Isopropanol	magnetit (Fe ₃ O ₄) untuk menangkap asam nukleat dari sampel biologis dan isopropanol untuk memisahkan dan mengendapkan DNA	Pencucian (Wash Buffer A (Tris HCl) dan Wash Buffer B (Tris HCl dan <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>))	Wash buffer A untuk menjaga pH dan wash buffer B untuk mencuci dan memastikan bahwa semua sisa-sisa kontaminan dihilangkan sebelum elusi
		Pencucian (Wash Buffer A (Tris HCl) dan Wash Buffer B (Tris HCl dan <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>))	Wash buffer A untuk menjaga pH dan wash buffer B untuk mencuci dan memastikan bahwa semua sisa-sisa kontaminan dihilangkan sebelum elusi	Elution Buffer (Tris HCl dan EDTA)	untuk menjaga PH dan mencegah degradasi asam nukleat selama penyimpanan
		Elution Buffer (Tris HCl dan EDTA)	untuk menjaga PH dan mencegah degradasi asam nukleat selama penyimpanan		

Pada metode resin yang tertera pada Tabel 6 dimana resin *Chelex* melakukan penangkapan ion logam yang terdiri dari resin polimer yang bermuatan, memiliki afinitas terhadap ion logam seperti Mg²⁺, Ca²⁺, dan Mn²⁺ yang penting untuk aktivitas enzim nuklease. Ketika resin *Chelex* ditambahkan ke dalam larutan, ion logam ini terikat secara reversibel oleh resin *Chelex*. Selain menangkap ion logam, resin *Chelex* juga dapat memecahkan ikatan kovalen yang stabil dalam protein. Hal ini penting dalam konteks ekstraksi DNA karena membantu dalam lisis sel dan pelepasan asam nukleat dari komponen seluler. Dengan menangkap ion logam yang diperlukan untuk aktivitas enzim nuklease, resin *Chelex* membantu mencegah degradasi DNA oleh enzim-enzim ini. Ini adalah salah satu alasan resin *Chelex*

sering digunakan dalam protokol ekstraksi DNA untuk memastikan kestabilan dan integritas molekul DNA yang diekstraksi. Resin *Chelex* juga dapat membantu dalam stabilisasi molekul DNA setelah diekstraksi, dengan mengurangi efek degradasi yang disebabkan oleh kontaminasi enzimatik atau ion logam.

Metode resin melibatkan penggunaan resin *Chelex* yang dapat mengikat logam berat dan ion lainnya yang dapat menghambat reaksi PCR. Proses modifikasi ini tidak hanya menyederhanakan protokol ekstraksi tetapi juga mengurangi waktu yang diperlukan untuk mendapatkan DNA siap pakai. Kelebihan utama dari metode ini adalah proses yang cepat dan biaya yang relatif rendah, karena hanya memerlukan bahan kimia dan peralatan yang sederhana. Namun, salah satu kelemahan dari metode ini adalah kemungkinan adanya inhibitor PCR dalam hasil akhir, yang dapat mempengaruhi kualitas amplifikasi DNA.

Pada metode lisis seperti yang tertera pada Tabel 6 dimana metode diawali dengan penambahan Lisis Buffer (SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*)) yang dapat memecah membran sel dan mengeluarkan konten seluler, termasuk asam nukleat. Setelah itu dilakukan penambahan Proteinase K yang merupakan enzim yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis ikatan peptida pada residu asam amino dengan sifat apapun, membuatnya efektif dalam menghilangkan sebagian besar protein dari sampel biologis lalu dilakukan lagi penambahan *Dithiothreitol* (DTT) mereduksi ikatan disulfida dan membantu dalam denaturasi protein atau pelepasan asam nukleat dari protein-protein yang terikat.

Pada metode lisis terdapat tahapan purifikasi seperti penangkapan asam nukleat menggunakan bahan seperti partikel magnetik yang difungsionalisasi dengan zat tertentu yang dapat menangkap dan mengikat asam nukleat dari larutan dan untuk memisahkan asam nukleat yang ditangkap dari kontaminan lainnya dalam sampel. Setelah itu dilakukan pencucian menggunakan wash buffer A dan wash buffer B. Wash Buffer A (Tris HCl) untuk menjaga pH dan wash buffer B (Tris HCl dan *Sodium Dodecyl Sulfate*) untuk mencuci dan memastikan bahwa semua sisa-sisa kontaminan dihilangkan sebelum elusi. Langkah terakhir dalam proses ekstraksi DNA adalah elusi menggunakan *Elution Buffer* (Tris HCl dan EDTA) dimana asam nukleat yang telah ditangkap dapat dilepaskan dari substrat

atau partikel yang digunakan untuk menangkapnya dan untuk menjaga PH serta mencegah degradasi asam nukleat selama penyimpanan.

Metode lisis menggunakan teknologi pemurnian lanjutan untuk menghasilkan DNA dengan kemurnian tinggi pada tahap purifikasi. Metode ini sangat efektif dalam menghilangkan inhibitor PCR dan kontaminan lainnya, yang penting untuk aplikasi *downstream* seperti PCR, sekuensing, dan analisis forensik. Meskipun prosesnya lebih kompleks dan membutuhkan waktu lebih lama serta biaya yang lebih tinggi, hasil DNA yang dihasilkan dari metode lisis sangat murni dan berkualitas tinggi walaupun kuantitasnya lebih sedikit. Hal ini menjadikan metode ini merupakan metode ekstraksi yang baik untuk menghasilkan profil DNA.

Metode resin untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi dan kualitas DNA, dikenal karena kesederhanaan dan kecepataannya. Sementara itu, metode lisis adalah teknik komersial yang dirancang untuk memaksimalkan pemurnian dan kualitas DNA pada tahap purifikasi, terutama dari sampel yang sulit.

Pada modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis yang tertera pada Tabel 6 dilakukan penambahan resin *Chelex* melakukan penangkapan ion logam yang terdiri dari resin polimer yang bermuatan, memiliki afinitas terhadap ion logam seperti Mg^{2+} , Ca^{2+} , dan Mn^{2+} yang penting untuk aktivitas enzim nuklease dan digabungkan dengan tahap purifikasi pada metode ekstraksi lisis penangkapan asam nukleat menggunakan bahan seperti partikel magnetik yang difungsionalisasi dengan zat tertentu yang dapat menangkap dan mengikat asam nukleat dari larutan dan untuk memisahkan asam nukleat yang ditangkap dari kontaminan lainnya dalam sampel. Setelah itu dilakukan pencucian menggunakan wash buffer A dan wash buffer B. Wash Buffer A (Tris HCl) untuk menjaga pH Dimana Tris-HCl bekerja sebagai buffer karena adanya gugus amin dan hidroksil yang memberikan kapasitas buffering yang baik di berbagai rentang pH, khususnya di sekitar pH 7,5 hingga 9. Gugus amin ($-NH_2$) pada Tris memberikan kemampuan untuk menerima atau melepaskan proton, menjaga pH larutan agar tetap relatif konstan meskipun ada penambahan kecil asam atau basa dan wash buffer B (Tris HCl dan *Sodium Dodecyl Sulfate*) untuk mencuci dan memastikan bahwa semua sisa-sisa kontaminan dihilangkan sebelum elusi dimana SDS bertindak sebagai agen denaturasi protein dengan mengikat kuat pada residu hidrofobik dalam rantai

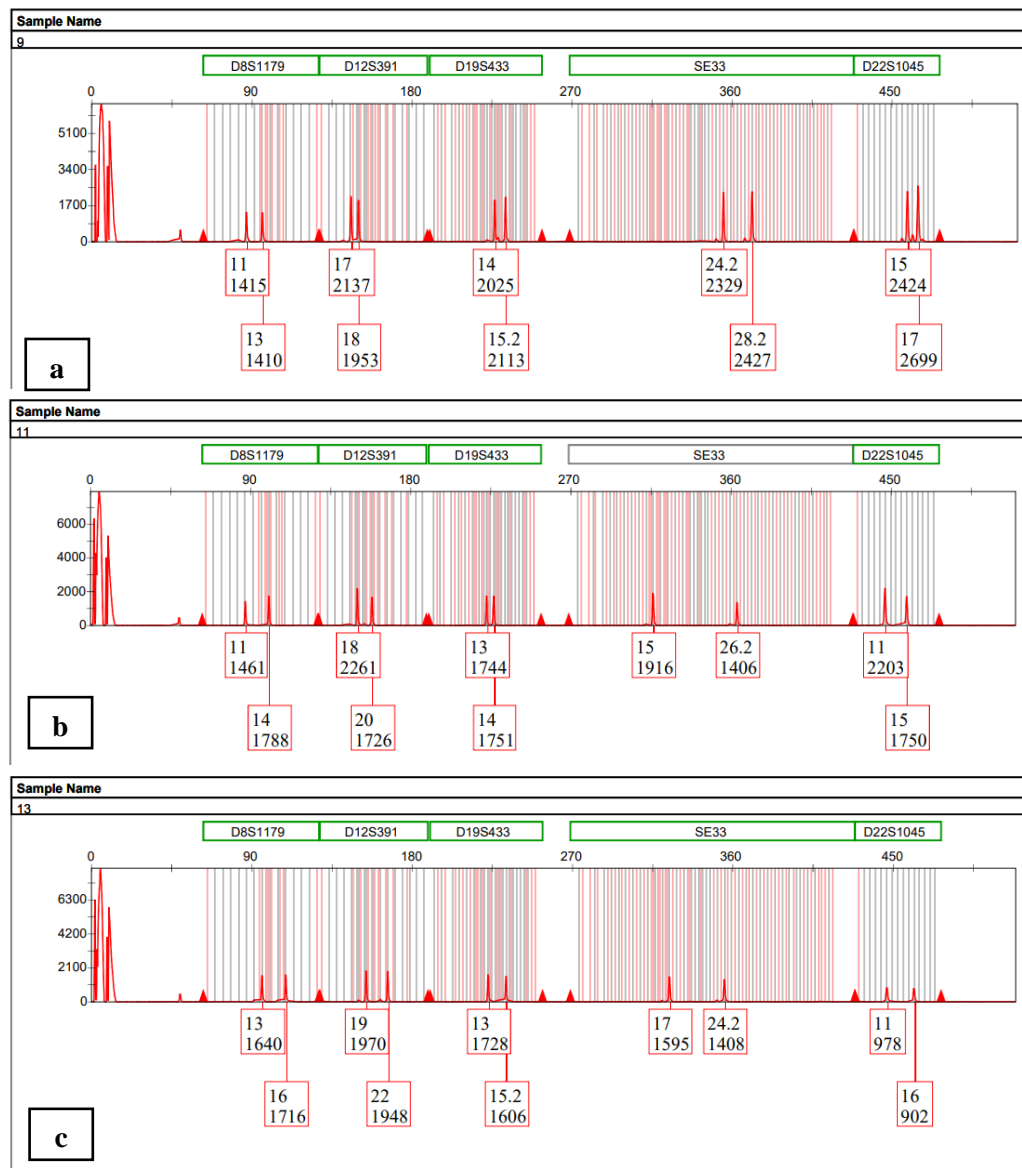
polipeptida. Langkah terakhir dalam proses ekstraksi DNA adalah elusi menggunakan *Elution Buffer* (Tris HCl dan EDTA) dimana asam nukleat yang telah ditangkap dapat dilepaskan dari substrat atau partikel yang digunakan untuk menangkapnya dan untuk menjaga PH serta mencegah degradasi asam nukleat selama penyimpanan karena EDTA berfungsi sebagai agen kompleksing atau kelat yang kuat terhadap ion logam divalen seperti Mg^{2+} atau Ca^{2+} yang diperlukan untuk aktivitas enzim nuclease dan dengan mengikat ion logam ini, EDTA menghambat aktivitas enzimatis nuclease yang mungkin masih aktif yang dapat menghidrolisis saat penyimpanan.

Pada modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis ini memberikan manfaat dari kedua pendekatan tersebut dimana metode resin menyediakan pendekatan cepat dan efisien untuk ekstraksi DNA awal, lalu digabungkan dengan tahap purifikasi metode lisis memastikan bahwa DNA yang dihasilkan memiliki kualitas yang sangat tinggi. Modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis ini menghasilkan DNA dengan kuantitas yang superior, mengurangi jumlah inhibitor yang dapat menghambat reaksi PCR dan aplikasi *downstream* lainnya. Hasil analisis menunjukkan bahwa modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis ini tidak hanya meningkatkan efisiensi ekstraksi tetapi juga menghasilkan DNA yang lebih stabil dan dapat diandalkan untuk berbagai aplikasi genetika.

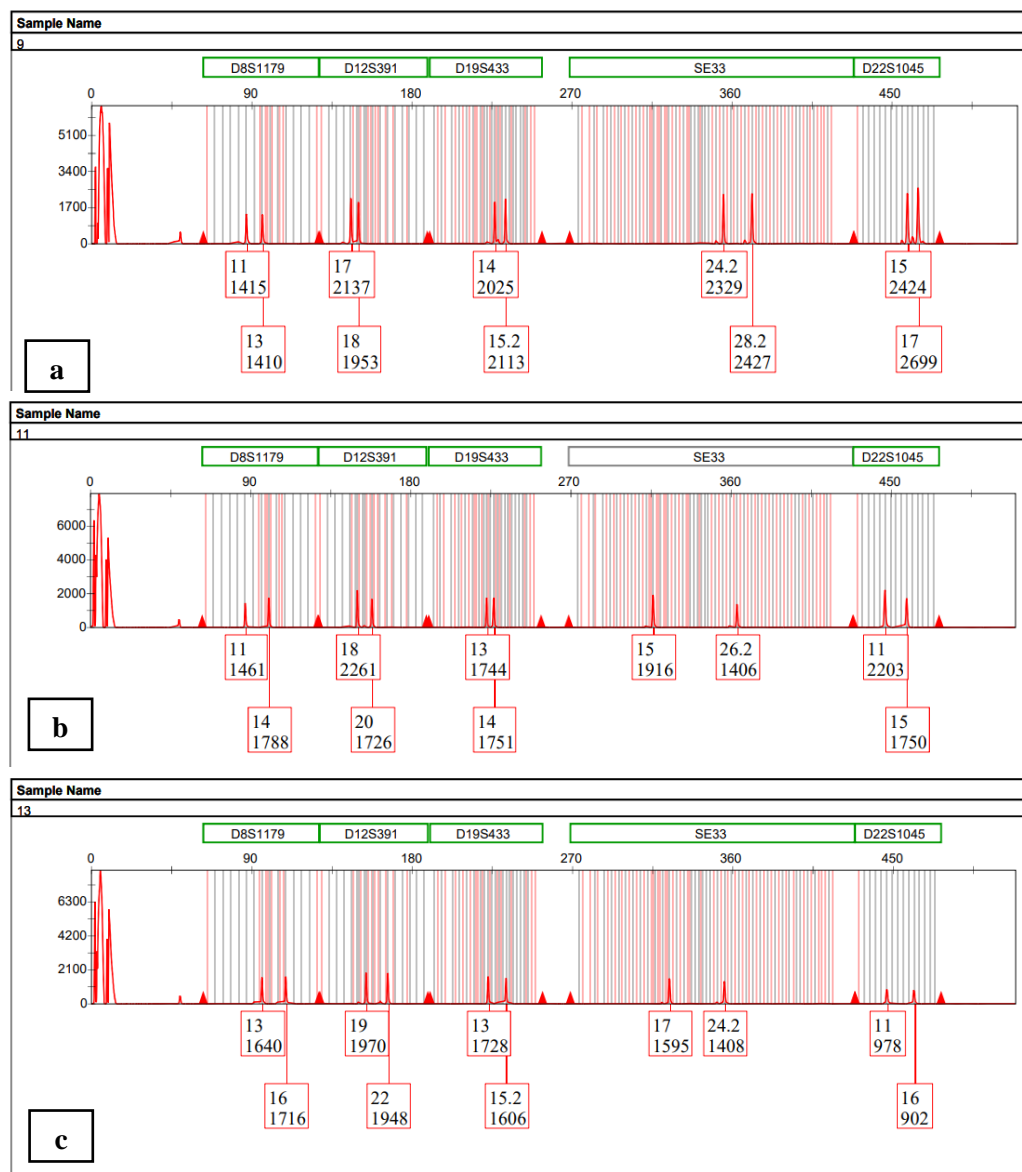
4.2 Hasil Elektroforesis Kapiler DNA

Analisis fragmen pada ketiga metode ekstraksi DNA yaitu metode resin, metode lisis, dan metode modifikasi resin dan lisis menggunakan *genetic analyzer*. Hasil elektroferogram dari ketiga metode tersebut sama-sama berhasil dalam proses *profiling* DNA, yang merupakan analisis untuk mengidentifikasi dan menganalisis pola fragmen DNA yang unik dari setiap individu. Pada ketiga metode sama-sama menjamin hasil yang presisi dalam profil DNA yang dihasilkan, sangat penting dalam aplikasi forensik dan penelitian genetik yang membutuhkan identifikasi yang tepat. Metode resin, metode lisis maupun metode modifikasi resin dan lisis memberikan konsistensi yang baik dalam hasil *profiling* DNA, memastikan bahwa analisis dapat diulang dengan hasil yang serupa. Profil DNA yang dihasilkan oleh ketiga metode ini memiliki kualitas yang tinggi, yang mendukung interpretasi yang

jelas dan presisi terhadap data genetik yang dianalisis yang tertera pada Gambar 8a, 8b dan 8c yang merupakan cuplikan elektroferogram dari sampel darah perwakilan yang nilainya paling tinggi dari setiap metode dan cuplikan elektroferogram dari sampel *buccal swab* perwakilan yang nilainya paling tinggi dari setiap metode tertera pada gambar 9a, 9b dan 9c.



Gambar 8. Cuplikan Elektroferogram Sampel Darah Perwakilan (a) Metode Resin, (b) Metode Lisis dan (c) Modifikasi Metode Resin dan Lisis



Gambar 9. Cuplikan Elektroferogram *Buccal Swab* Perwakilan (a) Metode Resin, (b) Metode Lisis dan (c) Modifikasi Metode Resin dan Lisis

Secara keseluruhan bahwa pada metode resin, metode lisis dan terutama pada pengembangan metode baru yaitu modifikasi resin dan lisis dengan sampel berupa sampel darah dan *buccal swab* sudah terbukti bahwa metode modifikasi resin dan lisis merupakan pilihan yang andal dan berkualitas untuk analisis *profiling* DNA dalam berbagai konteks aplikasi genetika molekuler. Data lengkap tertera pada Lampiran 3.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil uji kuantitatif pada sampel darah dengan modifikasi metode resin dan lisis, metode resin dan metode lisis dengan nilai rata-rata *T. Large Autosomal* 13,961 ng/ μ L; 3,971 ng/ μ L dan 0,339 ng/ μ L. Nilai rata-rata *T. Small Autosomal* 10,418 ng/ μ L; 2,472 ng/ μ L dan 0,234 ng/ μ L. Nilai rata-rata T. IPC 28,728; 28,527 dan 27,579. Pada nilai rata-rata DI 0,583; 0,748 dan 0,695.
2. Hasil uji kuantitatif pada *buccal swab* dengan modifikasi metode resin dan lisis, metode resin dan metode lisis dengan nilai rata-rata *T. Large Autosomal* 24,153 ng/ μ L; 3,544 ng/ μ L dan 0,486 ng/ μ L. Nilai rata-rata *T. Small Autosomal* 16,700 ng/ μ L; 2,513 ng/ μ L dan 0,409 ng/ μ L. Nilai rata-rata T. IPC 28,953; 28,437 dan 27,561. Pada nilai rata-rata DI 0,709; 0,787 dan 0,737.
3. Pada hasil uji kuantitatif menunjukkan bahwa modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis menghasilkan kuantitas DNA (*T. Large Autosomal* dan *T. Small Autosomal*) lebih tinggi pada sampel darah dan *buccal swab*. Nilai T. IPC yang lebih tinggi dan nilai DI yang lebih rendah menunjukkan degradasi DNA yang lebih sedikit. Secara keseluruhan, modifikasi ini lebih efektif dan andal untuk analisis profil DNA.

5.2 Saran

Perlu untuk menggunakan metode modifikasi resin dan lisis sebagai metode ekstraksi DNA dalam meningkatkan hasil kuantitas DNA dan diperlukan juga untuk mengoptimasi metode modifikasi resin dan lisis secara luas dalam analisis DNA forensik guna meningkatkan efisiensi dan akurasi hasil.

DAFTAR PUSTAKA

- Addgene. (2019). DNA Quantification. Retrieved August 20, 2019, from <https://www.addgene.org/protocols/dna-quantification/%0D>
- Albert, B., (1994). *Biologi Molekuler Sel Edisi Kedua*. Gramedia Pustaka Utama: Jakarta.
- Alketbi, S. K., & Goodwin, W. (2019). The effect of surface type, collection and extraction methods on touch DNA. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 7(1),704–706. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.10.145>.
- Avery JK, Chiego DJ. Essentials of oral histology and embryology. Ed 3. USA: Elsevier Saunders, 2006: 177-85.
- Badan Pusat Statistik (2018, 26 Desember). Statistik Kriminal 2018. Dikutip 20 Agustus 2019 dari : <https://www.bps.go.id/publication/2018/12/26/89c06f4651944f3be39006al/statistik-kriminal-2018.html>
- Badiye, A., Kapoor, N., & Shrivastava, P. (2020). Forensic DNA Evidence: From Crime Scene to Conviction. In *Forensic DNA Evidence: From Crime Scene to Conviction*. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6655-4_4
- Bath-Balogh, Mary. dan Fehrenbach, Margareth J. 2006. Illustrated Dental Embryologi, Histology and Anatomy (3th ed). Elsevier Sauders. Hal 99-100
- Barbaro, A., Cormaci, P., & Agostino, A. (2009). Validation of PrepFiler™ forensic DNA extraction kit (Applied Biosystems). *Forensic science International: Genetics supplement series*, 2(1), 176-177.
- Butler, J. M. (2005). Short tandem repeat analysis for human identity testing, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, Unit 14.8 (Supplement 41).
- Butler, J. M. (2015). *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. Maryland, USA: National Institute of Standards and Technology Gaithersburg.
- Cahyono. R. (2019). *DNA Isolation, Gel Electrophoresis, and PCR*, 15, 10-21070.

- Corvianindya, Y., & Auerkari, E. I. (2001). Studi molekuler pada instabilitas genetik: mekanisme kerusakan DNA dan proses perbaikannya. *Journal of Dentistry Indonesia*, 8(3), 44-50.
- Cromartie, R. L., Wardlow, A., Duncan, G., & McCord, B. R. (2019). Development of a microfluidic device (PADs) for forensic serological analysis. *Analytical Methods*, 11(5), 587-595. <https://doi.org/10.1039/c8ay02080a>
- Cruz, T. D., & Robb, S. E. (2018). Methods for Obtaining STR Quality Touch DNA From Archived Fingerprints. *Annotation*.
- Cummings, B. (2001). Human Anatomy and Physiology 7th ed. 2(2), 36-41.
- Dale, J. W., Schantz, M. V., & Greenspan, D. S. (2003). Book, Software, And Web Site Reviews-From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology. *Clinical Chemistry-International Journal of Laboratory Medicine and Molecular Diagnostic*, 49(12), 2115-2115.
- Dewanata, P. A., & Mushlih, M. (2021). Differences in DNA Purity Test Using UV-Vis Spectrophotometer and Nanodrop Spectrophotometer in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Indonesian Journal of Innovation Studies*, 15, 10-21070.
- Dhall, J. K., & Kapoor, A. (2016). Development of latent prints exposed to destructive crime scene conditions using wet powder suspensions. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(4), 396-404. <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2016.06.003>
- Diego, Alejandro, Alvarez. (2023). Comparing the Effectiveness of Photoluminescent Powders for the Development of Latent Fingerprints on Complex Surfaces. *Journal of forensic sciences & criminal investigation*, doi: 10.19080/jfsci.2023.16.555948
- Elishian, C., & Ketrin, R. (2011). PENGEMBANGAN MATERIAL SERBUK SILIKA UNTUK IDENTIFIKASI SIDIK JAR. *Jurnal Kimia Terapan Indonesia (Indonesian Journal of Applied Chemistry)*, 13(1). <https://doi.org/10.14203/jkti.v13i1.126>

- Ernawati, E., Puspitaningrum, D., & Pravitasari, A. (2014). Implementasi Algoritma Smith–Waterman Pada Local Alignment Dalam Pencarian Kesamaan Pensejajaran Barisan DNA (Studi Kasus: DNA Tumor Wilms). *Pseudocode*, 1(2), 170-177.
- Fahlevi, M. R., Bakti, D., Sitepu, S. F., & Prasetyo, A. E. (2018). Karakterisasi Molekuler *Elaeidobius kamerunicus* Faust.(Coleoptera: Curculionidae) Asal Sumatera Utara Menggunakan Metode Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP): Insect Molecular characterization of *Elaeidobius kamerunicus* Faust.(Coleoptera; Curculionidae) From North Sumatra Using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). *Jurnal Online Agroteknologi*, 6(2), 259-270.
- Fox, A. P., Gittos, M., Harbison, S., Fleming, R., & Wivell, R. (2014). Exploring the recovery and detection of messenger RNA and DNA from enhanced fingerprints in blood. *Science & Justice*, 54(3), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.01.001>
- Frandsen, R. D. (1981). *Anatomy and Physiology of Farm Animals* (4th ed.). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Furqoni, A. H., Yudianto, A., & Wardhani, P. (2017). Pengaruh Rendaman Air Terhadap Kualitas DNA pada Sperma dengan STR-CODIS D13S317 dan D21S1. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, 19(1), 41. <https://doi.org/10.20473/jbp.v19i1.2017.41-54>
- Gammon, K., Murray-Jones, K., Shenton, D., Wood, Z. J., & Mayers, C. (2019). Touch DNA on objects can be analysed at low cost using simplified direct amplification methods. *bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/540823>
- Gminski, R., Decker, K., Heinz, C., Seidel, A., Könczöl, M., Goldenberg, E., Grobéty, B., Ebner, W., Gieré, R., & Mersch-Sundermann, V. (2010). Genotoxic effects of three selected black toner powders and their dimethyl sulfoxide extracts in cultured human epithelial A549 lung cells in vitro.

Environmental and Molecular Mutagenesis, 52(4), 296–309.
<https://doi.org/10.1002/em.20621>

Haddad, Y., Dostalova, S., Kudr, J., Zitka, O., Heger, Z., & Adam, V. (2017). DNA-magnetic particle binding analysis by dynamic and electrophoretic light scattering. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(129), 1-9.
<https://doi.org/10.3791/56815>

Harush-Brosh, Y., Levy-Herman, Y., Bengiat, R., Oz, C., Levin-Elad, M., Horowitz, M., & Faerman, M. (2021). Back to *Amido Black*: Uncovering touch DNA in blood-contaminated fingerprints. *Journal of Forensic Sciences*, 66(5), 1697–1703. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14783>

Herman, H., Sunardi, S., & Famuji, T. S. (2023). Proses Implementasi Bioinformatika Pada Digitalisasi Data Genetika Manusia. *Simetris: Jurnal Teknik Mesin, Elektro Dan Ilmu Komputer*, 14(1), 1-12.

Initiative, P. D. (2015). Forensic Biology Screening Workshop - Blood. Retrieved August 21, 2019, from <https://slideplayer.com/slide/4462911/>

Isna, Komalasari., Fransiska, Sri, Herwahyu, Krismastuti., Christine, Elishian., Eka, Mardika, Handayani., Willy, Cahya, Nugraha., Rosi, Ketrin. (2017). Straightforward fabrication of black nano silica dusting powder for latent fingerprint imaging. doi: 10.1063/1.5011902

Jehuda, V. (2013). Ekstraksi DNA dari Sperma pada Kondom dan Kain yang Tersimpan Sampai Dua Belas Hari. *Simbiosis*, 1(1), 28-39.

Kartika Ratna Pertiwi dan EvyYulianti. 2011. Pengembangan Modul Pengayaan OSN SMP Materi Forensik. Laporan Penelitian. FMIPA UNY

Kavlick, M. F. (2018). Development of a universal internal positive control. *Biotechniques*, 65(5), 275-280.

Kelarakis, A., Krysmann, M.J. and Fernandes, D., University of Central Lancashire, 2020. *Method of fingerprinting with using carbogenic nanoparticle*. U.S. Patent 10,631,762.

- Khosravinia, H., & Ramesha, K. P. (2007). Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction. *African Journal of Biotechnology*, 6(3).
- Kirgiz, I., & Calloway, C. (2017). Increased recovery of *touch* DNA evidence using FTA paper compared to conventional collection methods.. *Journal of forensic and legal medicine*, 47, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.01.007>.
- Khosravinia, H., & Ramesha, K. P. (2007). Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction. *African Journal of Biotechnology*, 6(3).
- Lackey, A. (2018). How To Evaluate Forensic DNA Quality With Quantifiler Trio DNA Quantification Kit. *Behind the Bench*. Retrieved March 25, 2024, from <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/how-to-evaluate-forensic-dna-quality-with-quantifiler-trio-dna-quantification-kit/>
- Lin, S., Ip, S. C., Lam, T., Tan, T., Yeung, W., & Tam, W. (2016). Compatibility of DNA IQ™, QIAamp® DNA Investigator, and QIASymphony® DNA Investigator® with various fingerprint treatments. *International Journal of Legal Medicine*, 131(2), 293–301. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1447-8>
- Livy, A., Lye, S., Jagdish, C. K., Hanis, N., Sharmila, V., Ler, L. W., & Pramod, B. (2012). Evaluation of quality of DNA extracted from buccal swabs for microarray based genotyping. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 27, 28-33.
- Luftig, M. A. and Richey S. 2000. DNA and Forensic Science. *New England Law Review* .Vol. 35:3
- Maguire, C. (2013). *FBS11-Quantitation by real-time PCR using quantifiler duo*. Quantitation by Real-Time PCR Using Quantifiler Duo. https://dfs.dc.gov/sites/default/files/dc/sites/dfs/page_content/attachments/FBS11%20Real-Time%20PCR.pdf
- Marks, D.B., Marks, A.D., Smith, C.M. 1996. *Basic Medical Biochemistry*. Williams & Wilkins. Baltimore
- Marwayana, O.N., 2015. Ekstraksi Asam Deoksiribonukleat (DNA) Dari Sampel Jaringan Otot. *Osen*. Vol. 11(2)

- McKiernan, H. E., & Danielson, P. B. (2016). Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. In *Molecular Diagnostics: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00021-3>
- Mishra, I.K., Singh, B., Mishra, A., Mohapatra, B.K., Kaushik, R. and Behera, C., 2020. Touch Dna as Forensic Aid: A Review. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 14(2).
- Morihito, R. V., Chungdinata, S. E., Nazareth, T. A., Pulukadang, M. I., Makalew, R. A., & Pinontoan, B. (2017). Identifikasi perubahan struktur dna terhadap pembentukan sel kanker menggunakan dekomposisi graf. *Jurnal Ilmiah Sains*, 17(2), 153-160.
- Mulyani, Y., Purwanto, A., & Nurruhwati, I. (2011). Perbandingan beberapa metode isolasi DNA untuk deteksi dini koi herpes virus (KHV) pada ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Akuatika*, 2(1).
- Mustami, M. K., & Muthiadin, C. (2021). Konsep Dasar Pewarisan Gen pada Manusia. Gowa: Alauddin University Press.
- Nagy, Alfadaly. (2017). Evaluation of the Techniques Used In Analysis of *Touch* DNA Collected From Crime Tools in Hail, Kingdom Of Saudi Arabia. doi: 10.19080/JFSCI.2017.03.555624
- National Forensic Science Technology Centre. (2007). Leucomalachite Green Test for Presumptive Test for Blood. 1-3. Retrieved from https://static.training.nij.gov/lab-manual/Linked Documents/Protocols/pdi_lab_pro_2.18.pdf
- Neha, M., Mukesh, C., Saurabh, J., & Umema, A. (2023). Review of the Efficiency of Ten Different Commercial Kits for Extracting DNA from Soil Mixed Biological Samples. In *Journal of Forensic Science and Research* (Vol. 7, Issue 1, pp. 017–024). Heighten Science Publications Corporation. <https://doi.org/10.29328/journal.jfsr.1001045>
- Nimbkar, P. H., & Bhatt, V. D. (2022). A review on *touch* DNA collection, extraction, amplification, analysis and determination of phenotype. *Forensic Science International*, 336, 111352. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111352>

- Nur'aini, S., Mukaromah, A. S., & Muhlisoh, S. (2019). Pengenalan deoxyribonucleic acid (DNA) dengan marker-based augmented reality. *Walisongo Journal of Information Technology*, 1(2), 91-100.
- Pathologyoutlines. (2021). *Buccal Swab*. Retrieved from [2024 Diagnostic Pathology Update \(uscap.org\)](https://www.pathologyoutlines.com/diagnostic/Buccal-Swab.html)
- Parinduri, A. G. (2018). Identifikasi tulang belulang. *Anatomica Medical Journal*, 1(1), 2.
- Phillips, K., McCallum, N., & Welch, L. (2012). A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). *Forensic Science International: Genetics*, 6(2), 282-285.
- Pratiksha, H., Nimbkar., Vaibhav, D, Bhatt. (2022). A review on *touch* DNA collection, extraction, amplification, analysis and determination of phenotype.. *Forensic Science International*, Available from: 10.1016/j.forsciint.2022.111
- Quinones, I., & Daniel, B. (2012). Cell free DNA as a component of forensic evidence recovered from touched surfaces. *Forensic Science International: Genetics*, 6(1), 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.01.004>
- Sambrook, J. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual* Volume 1-3 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sampaio-Fernandes, M., Vaz, P. C., Braga, A. C., & Figueiral, M. H. (2015). IL1RN gene polymorphism in a Portuguese population with implant-supported overdentures—An observational study. *Revista 28 Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 56(4), 207-214.
- Sandwinata, M. F. (2018). Analisis DNA dalam Kasus Forensik. *Teknosains: Media Informasi Sains dan Teknologi*, 12(1).
- Schalm, O. W., & Carroll, E. J. (1975). *Schalm's Veterinary Hematology* (3rd ed.). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Sciencebooth. (2014). *The Structure of Bloods*. Retrieved from <https://sciencebooth.com/wp-content/uploads/2014/01/struktur-darah.jpg>
- Sessa, F., Salerno, M., Bertozzi, G., Messina, G., Ricci, P., Ledda, C., Rapisarda, V., Cantatore, S., Turillazzi, E., & Pomara, C. (2019). *Touch* DNA: impact of handling time on *touch* deposit and evaluation of different recovery techniques:

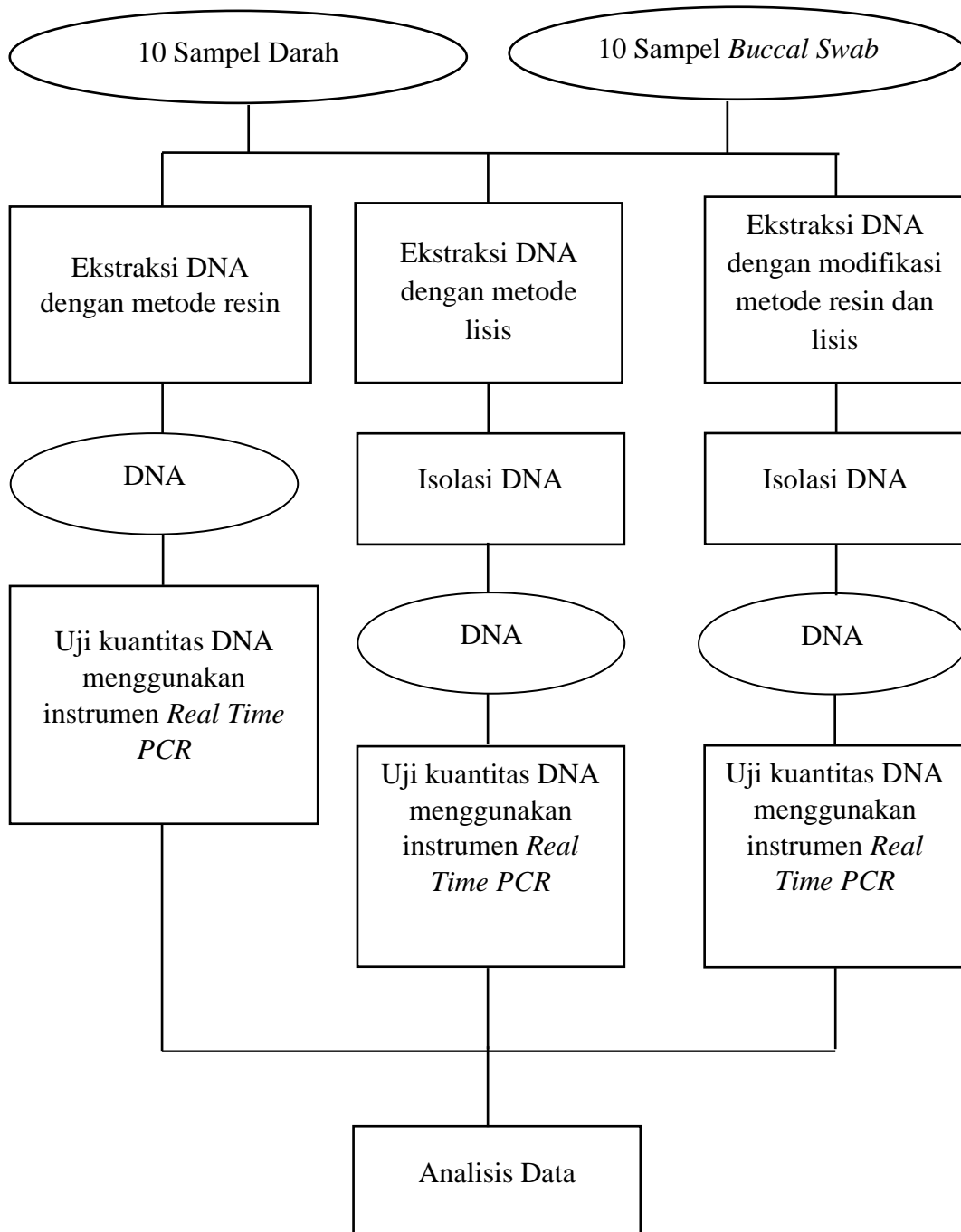
- An experimental study. *Scientific Reports*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46051-9>
- Stoop, B., Defaux, P., Utz, S., & Zieger, M. (2017). *Touch* DNA sampling with SceneSafe Fast™ minitapes.. *Legal medicine*, 29, 68-71.
- Suryadi, T. (2018). Degradasi DNA pada Jenazah yang Sudah Sangat Membusuk. *JURNAL KEDOKTERAN NANGGROE MEDIKA*, 1(1), 91–96.
<https://doi.org/10.35324/jknamed.v1i1.12>
- Tang, J. L., Ostrander, J., Wickenheiser, R., & Hall, A. (2020). *Touch* DNA in forensic science: The use of laboratory-created eccrine fingerprints to quantify DNA loss. *Forensic Science International: Synergy*, 2, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.fsisyn.2019.10.004>
- ThermoFisher. (2023). Forensic DNA Extraction Kit. Diakses 18 Agustus 2023 dari <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4463351>.
- Thornton, J. E. (2023). *Analysis of 'touch' DNA recovered from metal substrates: an investigation into cfDNA-metal interactions and the efficacy of different collection techniques on DNA yield*. <https://doi.org/10.33915/etd.11810>
- Tozzo, P., Giuliodori, A., Rodriguez, D., & Caenazzo, L. (2014). Effect of dactyloscopic powders on DNA profiling from enhanced fingerprints. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 35(1), 68–72.
<https://doi.org/10.1097/paf.0000000000000081>
- Tozzo, P., Mazzobel, E., Marcante, B., Delicati, A., & Caenazzo, L. (2022). *Touch* DNA sampling Methods: Efficacy evaluation and systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15541.
<https://doi.org/10.3390/ijms232415541>
- Valensa, Y., & Wijaya, I. P. (2016). Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi Aloksan. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, 5(4), 1-10.
- Weston, A., Brown, P. R., Jandik, P., Jones, W. R., & Heckenberg, A. L. (1992). Factors affecting the separation of inorganic metal cations by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 593(1-2), 289-295.
- X, Lu., Z, Xu., Q, S, Niu., Z, Tu. (2018). Application of *Touch* DNA in Investigation Practice. doi: 10.12116/J.ISSN.1004-5619.2018.03.015

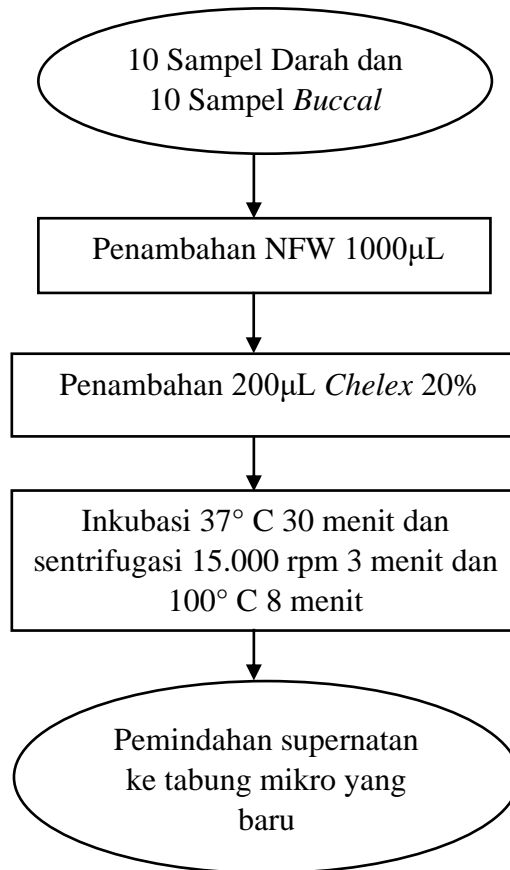
- Yosephi, V., Dhanardhono, T., & Saebani, S. (2016). *perbedaan kuantitas dna yang diekstrak dari akar rambut berbagai fase pertumbuhan* (Doctoral dissertation, Diponegoro University).
- Yudianto, A. & Kusuma, S. E. (2002). *DNA isolation from sweat stain in clothes as forensic identification material*, *Folia Medica Indonesiana*, 42(4), pp. 205–208.
- Yudianto, A., & Sispitasari, Y. E. (2016). *Isolasi DNA dari Bercak Urine Manusia sebagai Bahan Alternatif Pemeriksaan Identifikasi Personal*. *MPI (Media Pharmaceutica Indonesiana)*, 1(1), 53-61.

LAMPIRAN

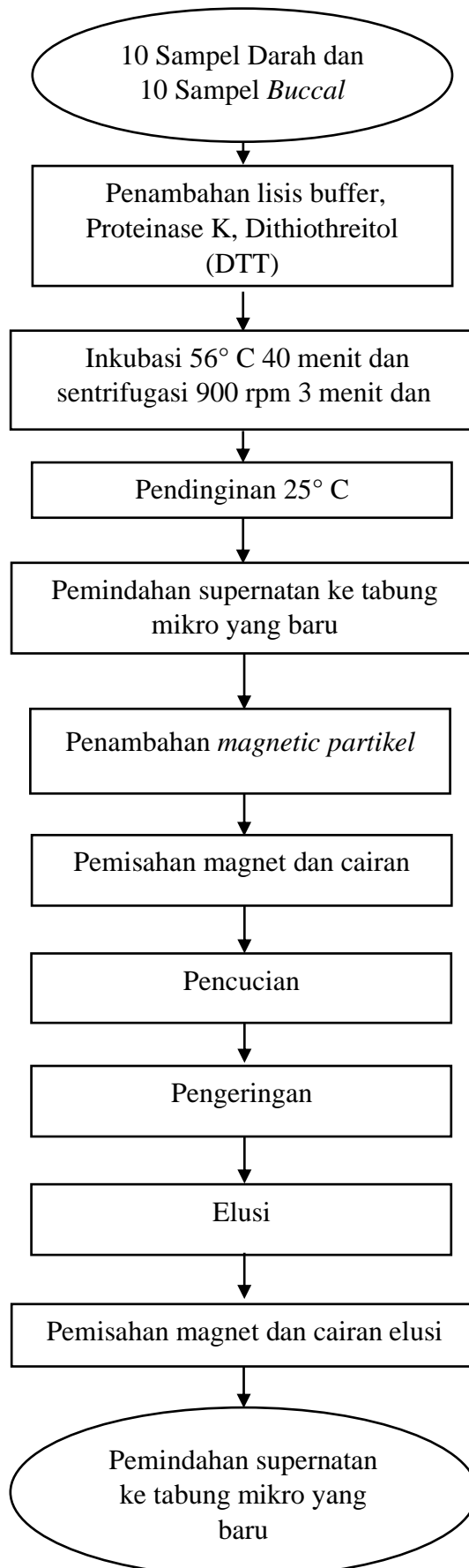
Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian

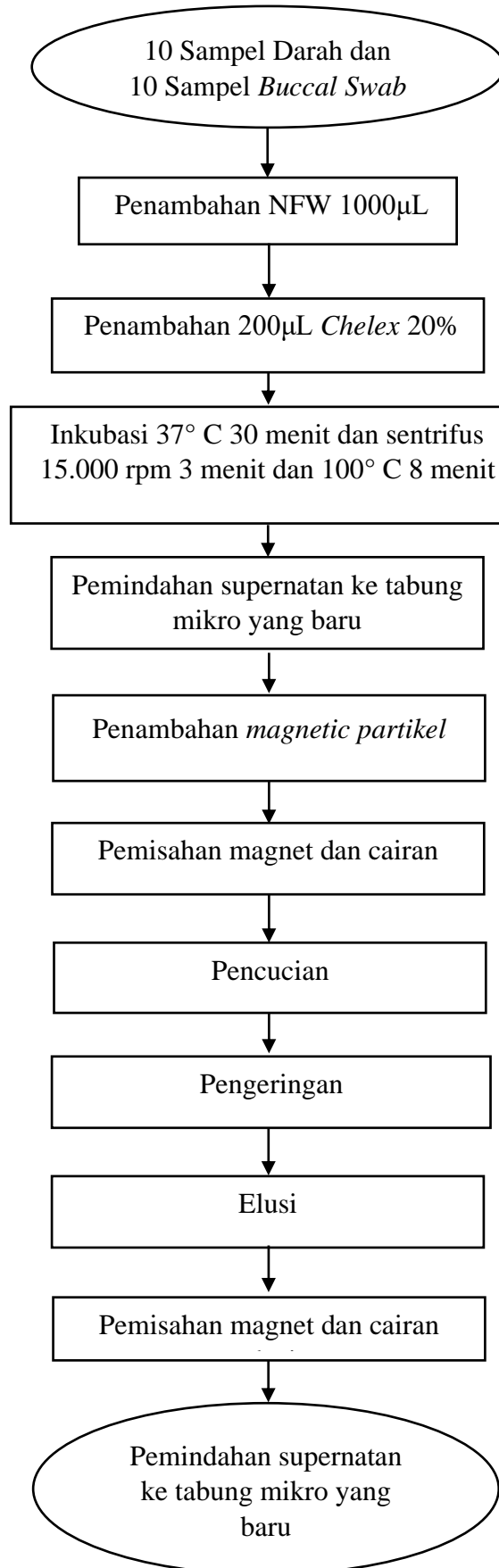
A. Diagram Umum Penelitian

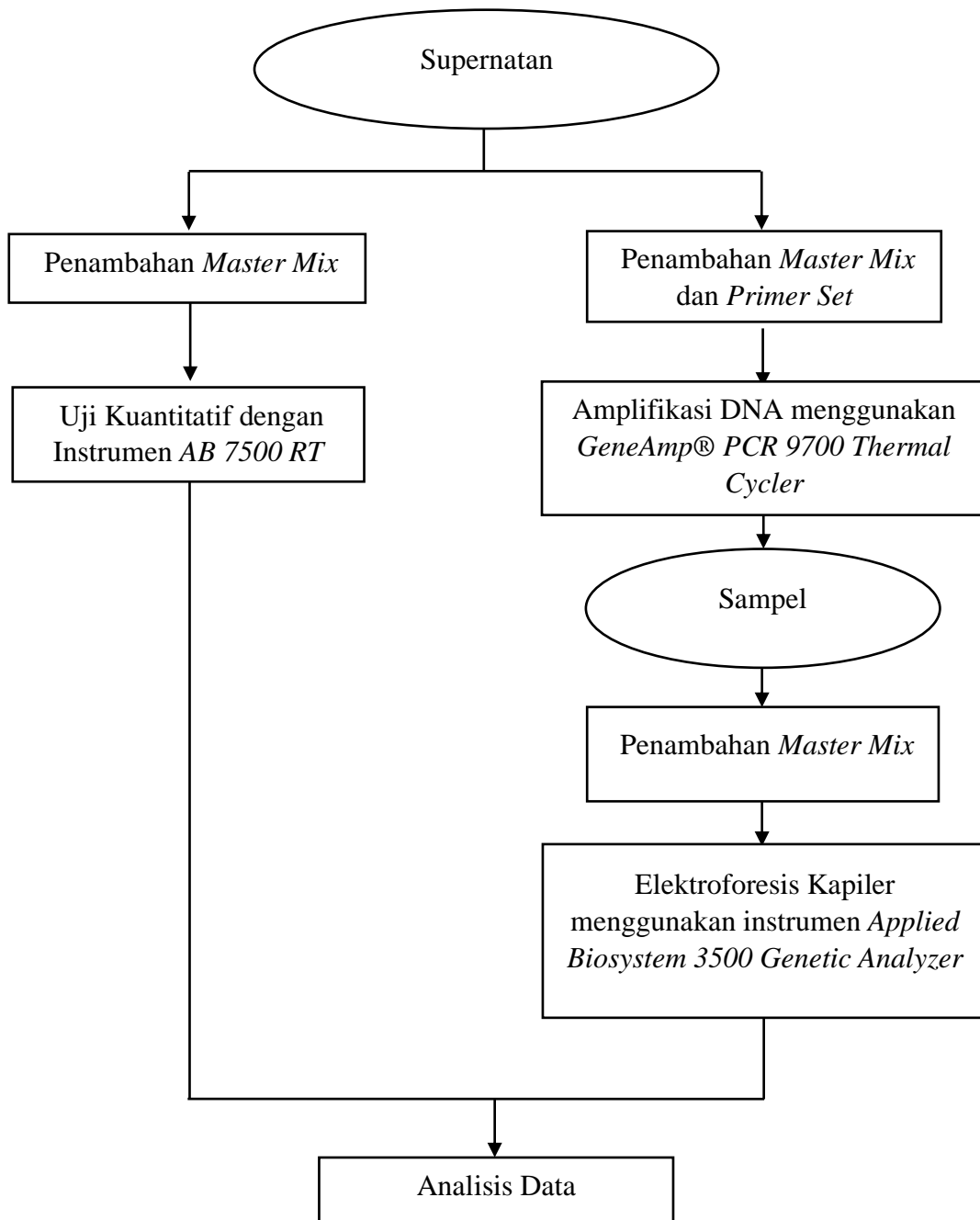


B. Ekstraksi DNA dengan metode resin

C. Isolasi DNA dengan metode ekstraksi lisis



D. Isolasi DNA dengan modifikasi metode ekstraksi resin dan lisis

E. Kuantifikasi DNA

Lampiran 2. Hasil Uji Anova dan Uji Duncan

A. Hasil Uji Anova dan Uji Duncan pada *T. Large Autosomal*

Sk	Db	Jk	Kt	F Hitung	F Tabel		Ket
					5%	1%	
A	2	3952.69	1976.35	892.68	3.17	5.02	**
B	1	163.71	163.71	73.95	4.02	7.13	**
AB	2	356.66	178.33	80.55	3.17	5.02	**
Galat	54	119.55	2.21				
Total	59	4592.62					

Keterangan:

** : berbeda sangat nyata

Pada tabel diatas merupakan hasil analisis ragam (Anova) parameter *T. Large Autosomal*. Pembacaan Anova yaitu dengan membandingkan F hitung perlakuan dengan F tabel. Apabila F hitung lebih besar dari F tabel 1% maka perlakuan berbeda sangat nyata. Apabila F hitung perlakuan lebih kecil dari F tabel 1% tetapi lebih besar dari F tabel 5% maka perlakuan berbeda nyata. Apabila F hitung perlakuan lebih kecil dari F tabel 5% maka perlakuan tidak berbeda nyata. Berdasarkan hasil uji Anova pada *T. Large Autosomal* F hitung faktor A (Metode), faktor B (Sampel) dan interaksi keduanya (AB) lebih besar dari F tabel 1% sehingga faktor A (Metode), faktor B (Sampel) dan interaksi (AB) berbeda sangat nyata. Karena berbeda nyata maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji Duncan dengan hasil sebagai berikut:

Faktor A	Rata-Rata	Standar Deviasi	Notasi
A2 (Lisis)	0.41	0.29	a
A1 (Resin)	3.76	0.53	b
A3 (Modifikasi Resin dan Lisis)	19.06	5.77	c

Berdasarkan hasil uji Duncan yang tertera pada tabel diatas faktor A (Metode) memiliki notasi yang berbeda satu dengan yang lain sehingga metode A2, A1 dan A3 berbeda nyata satu dengan yang lain. Dilihat dari rata-rata, faktor dengan rata-rata tertinggi yaitu A3 (Modifikasi Resin dan Lisis) dan berbeda nyata dengan A2 (Lisis) dan A1 (Resin) sehingga dilihat dari faktor A (Metode), faktor A3 (Modifikasi Resin dan Lisis) adalah metode terbaik.

Perlakuan	Rata-Rata	Standar Deviasi	Notasi
A2B1	0.34	0.23	a
A2B2	0.49	0.33	a
A1B2	3.54	0.32	b
A1B1	3.97	0.63	b
A3B1	13.96	1.10	c
A3B2	24.15	3.38	d

Pembacaan hasil uji Duncan yaitu dengan melihat notasi faktor perlakuan. Perlakuan dengan notasi yang sama tidak berbeda nyata. Sebaliknya perlakuan dengan notasi yang berbeda, berbeda nyata. Berdasarkan hasil uji Duncan interaksi A3B2 (Modifikasi Resin dan Lisis sampel *buccal swab*) memiliki rata-rata tertinggi dan berbeda nyata dengan seluruh perlakuan yang lainnya sehingga A3B2 (Modifikasi Resin dan Lisis sampel *buccal swab*) merupakan perlakuan terbaik dilihat dari interaksi perlakuan.

B. Hasil Uji Anova dan Uji Duncan pada *T. Small Autosomal*

Sk	Db	Jk	Kt	F Hitung	F Tabel		Ket
					5%	1%	
A	2	2016.06	1008.03	675.75	3.17	5.02	**
B	1	70.41	70.41	47.20	4.02	7.13	**
AB	2	127.11	63.56	42.61	3.17	5.02	**
Galat	54	80.55	1.49				
Total	59	2294.14					

Keterangan:

** : berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil uji Anova pada *T. Small Autosomal* yang tertera pada diatas F hitung faktor A (Metode), faktor B (Sampel) dan interaksi keduanya (AB) lebih besar dari F tabel 1% sehingga faktor A (Metode), faktor B (Sampel) dan interaksi (AB) berbeda sangat nyata. Karena berbeda nyata maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji Duncan dengan hasil sebagai berikut:

Faktor A	Rata-Rata	Stdade Deviasi	Notasi
A2 (Lisis)	0.32	0.24	a
A1 (Resin)	2.49	0.30	b
A3 (Modifikasi Resin dan Lisis)	13.56	3.81	c

Pembacaan hasil uji Duncan yaitu dengan melihat notasi faktor perlakuan. Perlakuan dengan notasi yang sama tidak berbeda nyata. Sebaliknya perlakuan dengan notasi yang berbeda, berbeda nyata. Berdasarkan hasil uji Duncan yang tertera pada tabel diatas bahwa faktor A (Metode) memiliki notasi yang berbeda satu dengan yang lain sehingga metode A2, A1 dan A3 berbeda nyata satu dengan yang lain. Dilihat dari rata-rata, faktor dengan rata-rata tertinggi yaitu A3 (Modifikasi Resin dan Lisis) dan berbeda nyata dengan A2 (Lisis) dan A1 (Resin) sehingga dilihat dari faktor A (Metode), faktor A3 (Modifikasi Resin dan Lisis) adalah metode terbaik.

Perlakuan	Rata-Rata	Standar Deviasi	Notasi
A2B1	0.23	0.15	a
A2B2	0.41	0.29	a
A1B1	2.47	0.26	b
A1B2	2.51	0.34	b
A3B1	10.42	2.43	c
A3B2	16.70	1.67	d

Pembacaan hasil uji Duncan yaitu dengan melihat notasi faktor perlakuan. Perlakuan dengan notasi yang sama tidak berbeda nyata. Sebaliknya perlakuan dengan notasi yang berbeda, berbeda nyata. Berdasarkan hasil uji Duncan yang tertera pada diatas menyatakan bahwa interaksi A3B2 (Modifikasi Resin dan Lisis sampel *buccal swab*) memiliki rata-rata tertinggi dan berbeda nyata dengan seluruh perlakuan yang lainnya sehingga A3B2 (Modifikasi Resin dan Lisis sampel *buccal swab*) merupakan perlakuan terbaik dilihat dari interaksi perlakuan.

C. Hasil Uji Anova pada T. IPC

Sk	Db	Jk	Kt	F Hitung	F Tabel		Ket
					5%	1%	
A	2	33.69	16.84	1.24	3.17	5.02	tn
B	1	14.52	14.52	1.06	4.02	7.13	tn
AB	2	23.90	11.95	0.88	3.17	5.02	tn
Galat	54	736.31	13.64				
Total	59	808.42					

Keterangan:

tn: tidak berbeda nyata

Tabel di atas merupakan hasil analisis ragam (Anova) pada T.IPC. Pembacaan Anova yaitu dengan membandingkan F hitung perlakuan dengan F

tabel. Apabila F hitung lebih besar dari F tabel 1% maka perlakuan berbeda sangat nyata. Apabila F hitung perlakuan lebih kecil dari F tabel 1% tetapi lebih besar dari F tabel 5% maka perlakuan berbeda nyata. Apabila F hitung perlakuan lebih kecil dari F tabel 5% maka perlakuan tidak berbeda nyata. Berdasarkan hasil uji Anova yang tertera pada Tabel 13 bahwa F hitung faktor A (Metode), faktor B (Sampel) dan interaksi keduanya (AB) lebih kecil dari F tabel 5% sehingga faktor A (Metode), faktor B (Sampel) dan interaksi (AB) tidak berbeda nyata. Karena tidak berbeda nyata maka tidak dilakukan uji lanjut dan disimpulkan bahwa T.IPC dilihat dari metode, sampel dan interaksi keduanya semuanya sama (tidak berbeda nyata) sehingga untuk parameter T. IPC tidak ada perlakuan terbaik.

D. Hasil Uji Anova pada *Degradation Index*

Sk	Db	Jk	Kt	F Hitung	F Tabel		Ket
					5%	1%	
A	2	0.03	0.02	0.44	3.17	5.02	tn
B	1	0.07	0.07	1.82	4.02	7.13	tn
AB	2	0.14	0.07	1.77	3.17	5.02	tn
Galat	54	2.10	0.04				
Total	59	2.35					

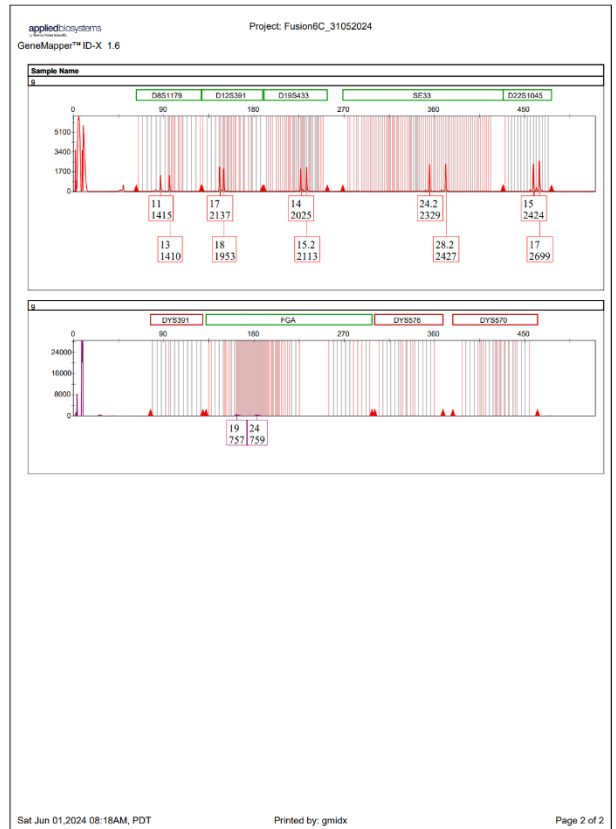
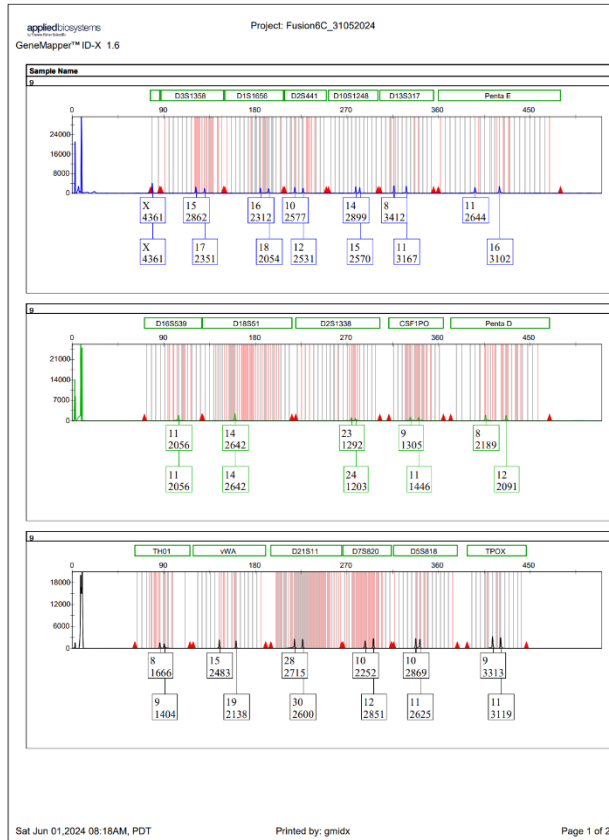
Keterangan:

tn: tidak berbeda nyata

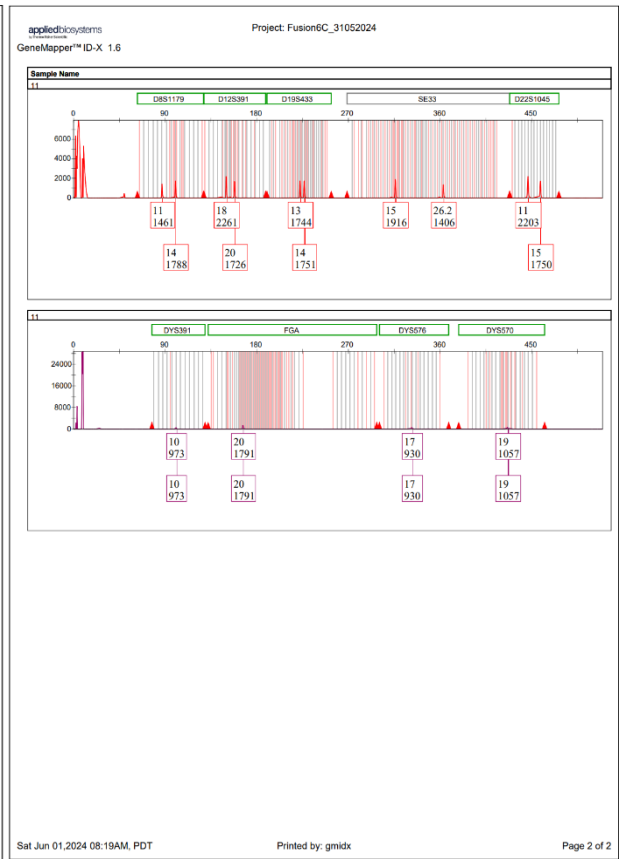
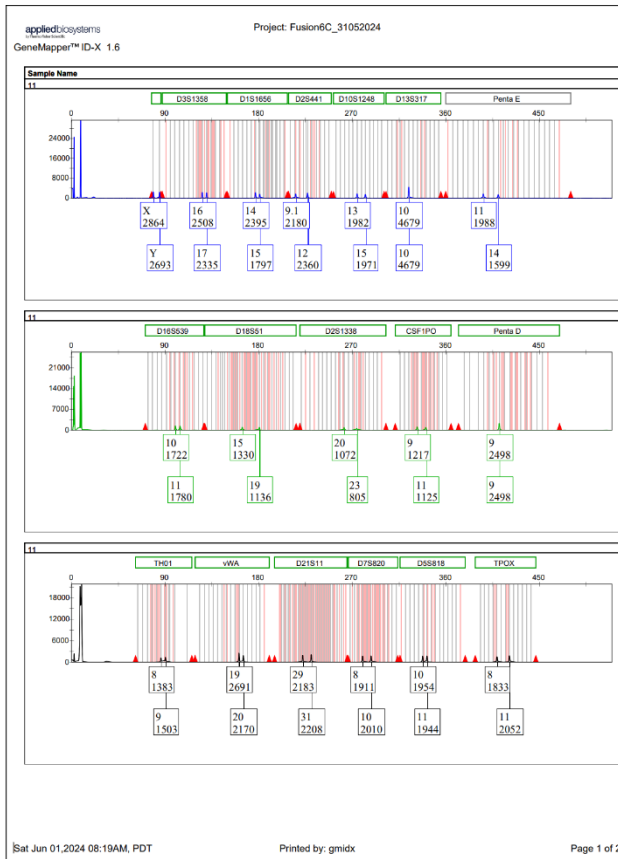
Tabel di atas merupakan hasil analisis ragam (Anova) pada *Degradation Index*. Pembacaan Anova yaitu dengan membandingkan F hitung perlakuan dengan F tabel. Apabila F hitung lebih besar dari F tabel 1% maka perlakuan berbeda sangat nyata. Apabila F hitung perlakuan lebih kecil dari F tabel 1% tetapi lebih besar dari F tabel 5% maka perlakuan berbeda nyata. Apabila F hitung perlakuan lebih kecil dari F tabel 5% maka perlakuan tidak berbeda nyata. Berdasarkan hasil uji Anova yang tertera pada Tabel 14 bahwa F hitung faktor A (Metode), faktor B (Sampel) dan interaksi keduanya (AB) lebih kecil dari F tabel 5% sehingga faktor A (Metode), faktor B (Sampel) dan interaksi (AB) tidak berbeda nyata. Karena tidak berbeda nyata maka tidak dilakukan uji lanjut dan disimpulkan bahwa *Degradation Index* dilihat dari metode, sampel dan interaksi keduanya semuanya sama (tidak berbeda nyata) sehingga untuk parameter *Degradation Index* tidak ada perlakuan terbaik.

Lampiran 3. Hasil Elektroferogram

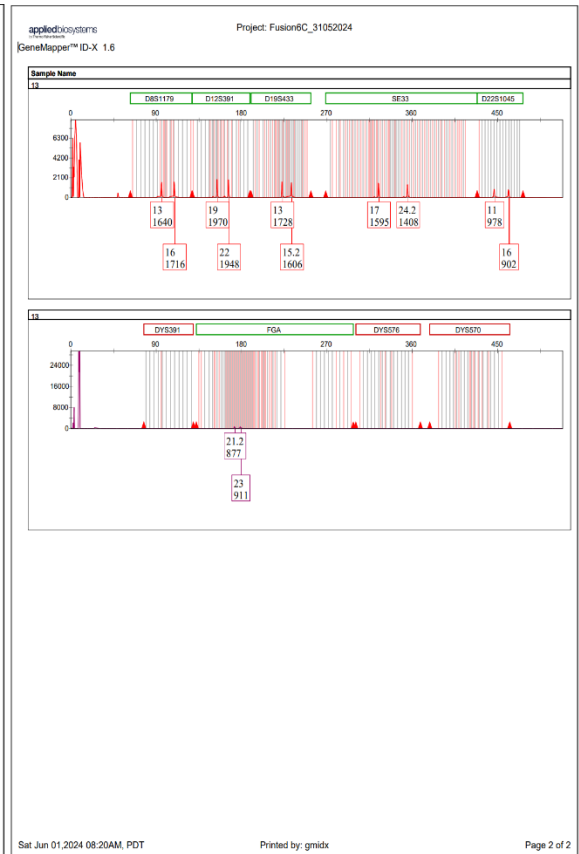
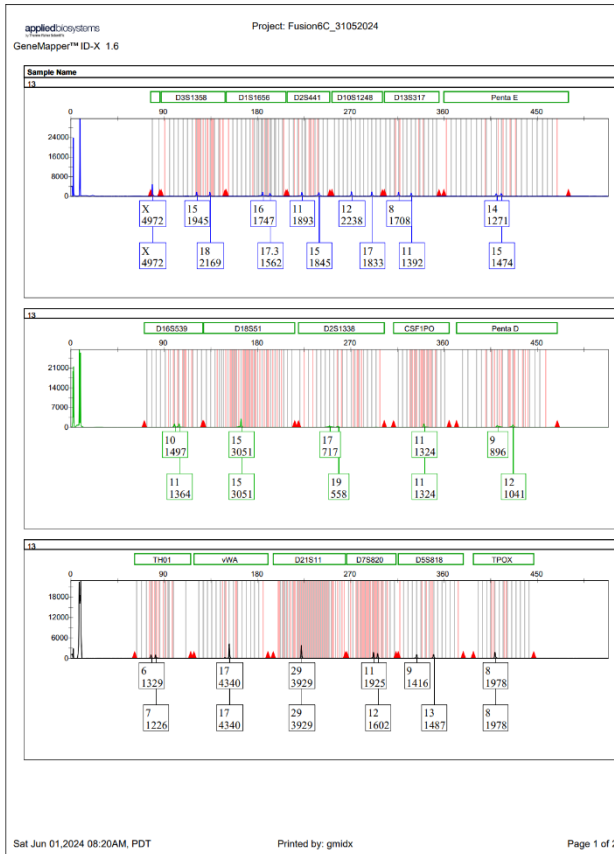
A. Elektroferogram Sampel Darah Perwakilan dengan Metode Resin



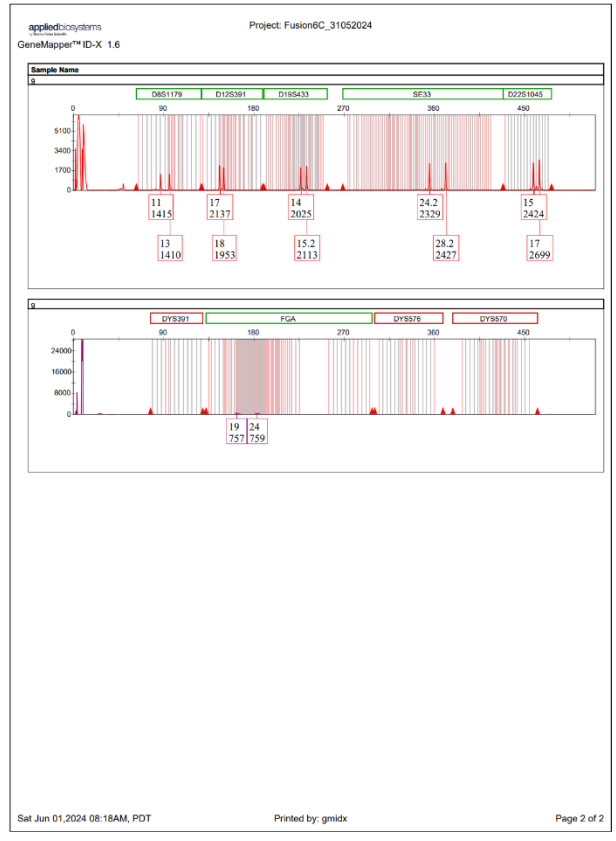
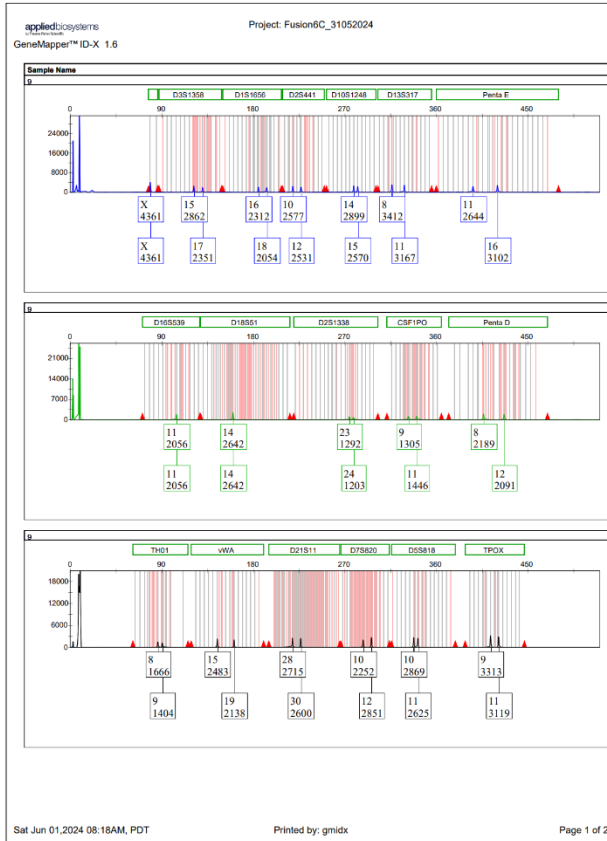
B. Elektroferogram Sampel Darah Perwakilan dengan metode Lisis



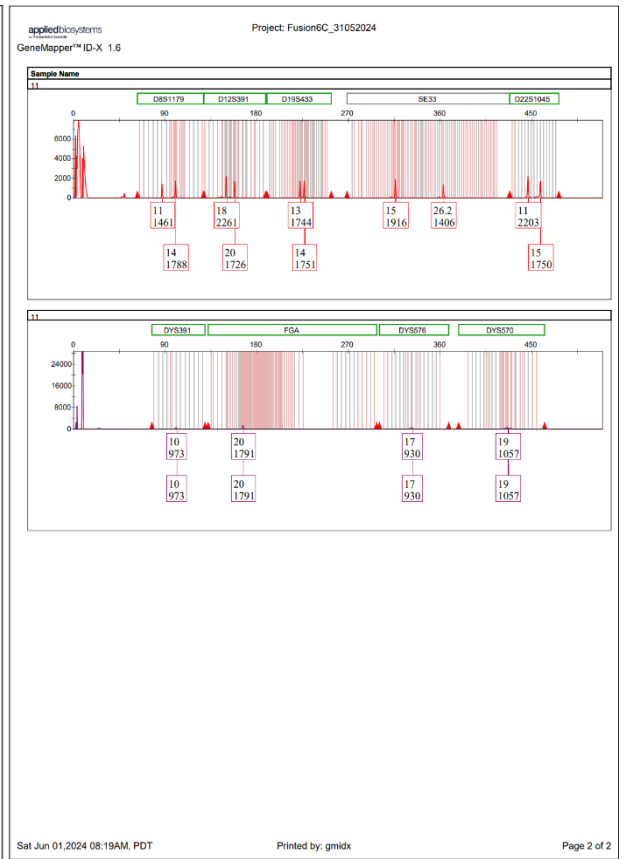
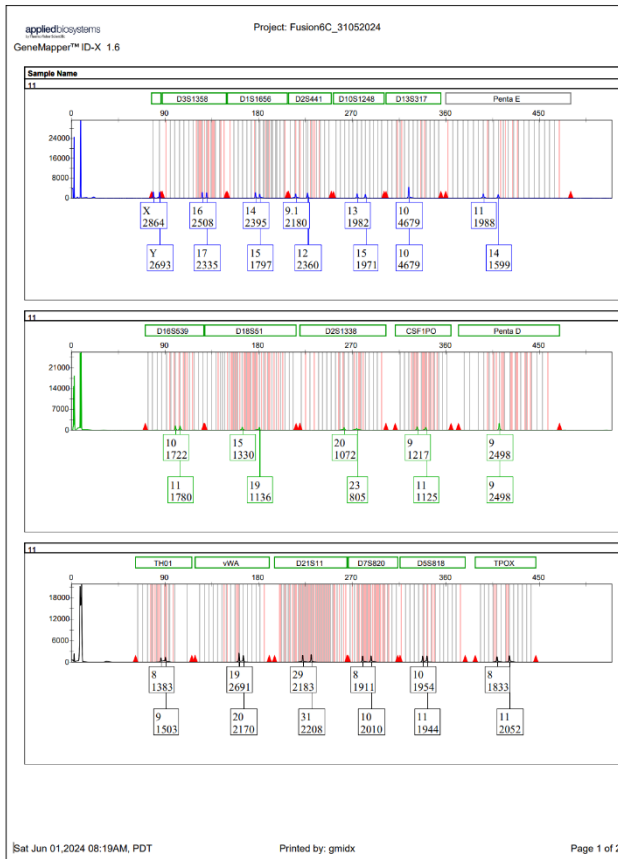
C. Elektroferogram Sampel Darah Perwakilan dengan metode modifikasi Resin dan Lisis



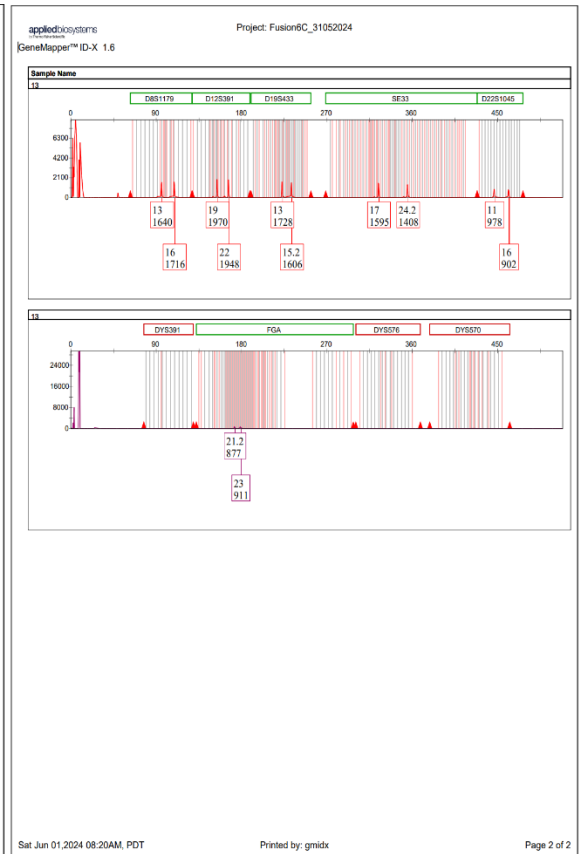
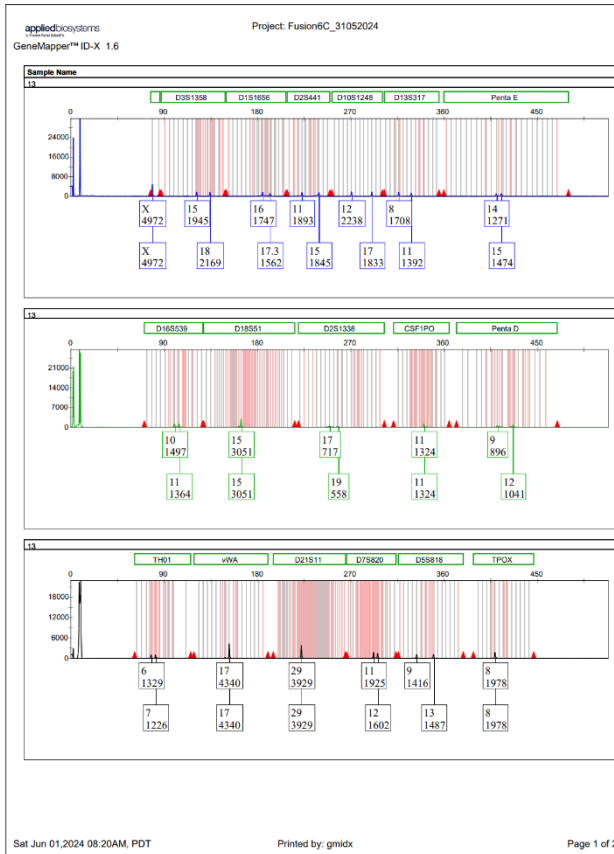
D. Elektroferogram *Buccal Swab* Perwakilan dengan Metode Resin




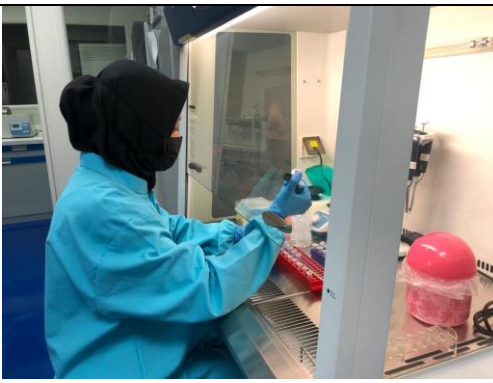
E. Elektroferogram Sampel *Buccal Swab* Perwakilan dengan metode Lisis

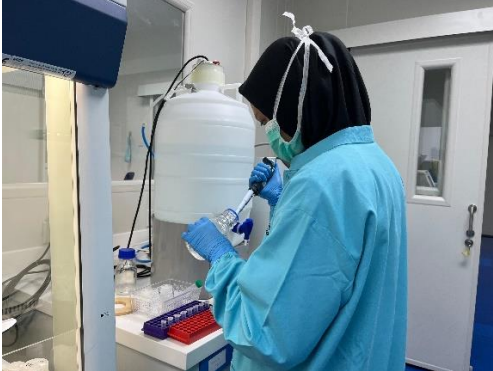



F. Elektroferogram *Buccal Swab* Perwakilan dengan metode modifikasi Resin dan Lisis



Lampiran 4. Dokumentasi

NO		DOKUMENTASI	PERLAKUAN
1.			Preparasi Sampel
2.			Ekstraksi DNA

4.			Amplifikasi DNA
5.			Analisis Data