

Analisis DNA Jaringan Lunak Manusia yang Terpapar Formalin dalam Interval Waktu 1 Bulan Selama 6 Bulan pada Locus D13S317 dengan Metode STR-PCR

(The Analyze of Human DNA Soft Tissue that Contaminated Formalin During 1 Month and 6 Month at Locus D13S317 using STR-PCR)

Arlene Kusumadewi *, Soekry Erfan Kusuma**, Ahmad Yudianto**

ABSTRACT

Dead body preservation by using formalin 10% injection is a procedure that has been laid down in medical institution to preserve the abandon deboddy who's still intact before used as a research object. The similar thing was also been done because of recent reason, for instance his or her family wants to keep the dead body more than 24 hours before it is buried or being cremation, therefore, in order to safe the environment, the dead body should be righteously preserved. Objective of this study was to analysis of formalin impact 6 month until 1 month interval against human soft tissue DNA. To the effect of observational it is subject to be menganalisis formal presentation influence with time interval 1 month up to 6 months to DNA human soft network as material as DNA'S check at forensic area. This observational type is experimental laboratoris with DNA'S sample indigenous core a part human soft network musculus psoas major that is taken from one jenasah abandon at Forensic Medical Science Installation RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Analisis's result points out to get a long time formal presentation that is given on human soft network sample, therefore available DNA'S rate trend that gets menurun but still lies on minimal sill point needed DNA rate on check Short is Repeat's Tandem (STR). DNA'S visualisation result on FGA'S locus, D13S317, D18S51 and D21S11 in observational it all still gets to be detected. Decrease titrates DNA on human soft network one most formal flat that not evoke meaning effect, that cause DNA human soft network that its ability loss as material as DNA'S identification forensic.

Key words: Human soft tissue DNA, formalin expossure, STR-PCR

PENDAHULUAN

Dalam bidang forensik dikenal istilah jenasah terlantar. Arti istilah jenasah terlantar itu sendiri adalah jenasah seseorang tanpa keluarga atau ahli waris yang tidak teridentifikasi keluarganya setelah 2 × 24 jam (Yudianto, 2010). Keberadaan jenasah terlantar menjadi hal yang menarik untuk dikaji, terutama bila menyangkut persoalan yang berhubungan dengan hukum seperti persoalan warisan, paternitas, atau jenasah yang diduga merupakan korban pada aksi kriminal.

Jumlah jenasah terlantar (jenasah T4: jenasah tempat tinggal tidak tetap) memiliki kecenderungan banyak ditemukan. Data dari Instalasi Kedokteran Forensik dan medikolegal RSUD Dr. Soetomo Surabaya menyatakan bahwa pada tahun 2008 terdapat 98 jenasah terlantar,

sedangkan pada tahun 2009 terdapat 83 jenasah terlantar dan tahun 2010 terdapat 74 jenasah. Data ini diperkuat oleh data yang ada di RS Sukanto Keramat Jati Jakarta Timur, hampir tiap bulan terdapat sekitar 30 mayat tidak dikenal dibawa masuk, juga dikenal dengan sebutan Mr X.

Secara prosedural jenasah yang masuk di kamar jenasah disimpan di *cooling unit* sampai ada pihak keluarga yang mengakui keberadaan jenasah tersebut. Jika dalam waktu 1 bulan tidak ada pihak keluarga yang mengakui tentang keberadaan jenasah tersebut, maka pihak yang berwenang (rumah sakit) mengambil kebijaksanaan untuk menyimpan jenasah tersebut dalam *container* dengan suhu 1–3° C. Pada jenasah terlantar yang relatif masih utuh, sesuai prosedur yang ada dapat diserahkan pada pihak pendidikan kedokteran setelah 3 bulan terhitung sejak belum adanya pihak keluarga yang mengakui jenasah

* Universitas Hang Tuah Surabaya

** Fakultas Kedokteran Universiats Airlangga

tersebut. Walaupun telah diserahkan di institusi pendidikan kedokteran, jenazah tidak boleh dijadikan bahan praktikum bagi kepentingan mahasiswa kedokteran sampai jangka waktu 6 bulan, sambil menunggu pihak keluarga yang kemungkinan akan datang, sehingga pihak Fakultas Kedokteran tetap harus melakukan pengawetan terhadap jasad jenazah tersebut (**Astiti**, 2010).

Pengawetan jenazah bertujuan untuk mencegah pembusukan. Mekanisme pembusukan disebabkan karena autolisis yakni tubuh mempunyai enzim yang setelah mati dapat merusak tubuh sendiri. Selain itu pengawetan diperlukan untuk menghambat aktivitas kuman (**Astiti**, 2010).

Salah satu metode pengawetan jenazah yaitu dengan injeksi formalin yang disebut dengan metode konvensional yang mempunyai kelebihan yaitu jenazah dapat digunakan dalam jangka panjang dibanding dengan metode *noninvasif*, yaitu menggunakan *spray gel* yang dimasukkan ke mulut, hidung, dan pantat jenazah. Ada juga bentuk bubuk dengan melumuri jenazah. Keuntungan metode ini tidak merusak jenazah. Baunya harum karena menggunakan aroma terapi. Jenazah tidak kaku dan lembek. Kelemahannya hanya bisa digunakan kurang dari lima hari sedangkan formalin dapat digunakan dalam jangka lebih lama.

Jenazah disuntik formalin 10% dan disimpan paling sedikit 6 bulan sebelum dilakukan otopsi anatomis. Dalam tenggang waktu tersebut apabila ada keluarga terdekat yang mencari, maka jenazah diberikan kepada keluarganya untuk dimakamkan.

Hal serupa pengawetan juga dilakukan jika oleh suatu alasan tertentu, keluarga ingin menyimpan jenazah lebih dari 24 jam sebelum dikubur atau dikremasi, maka demi keamanan lingkungan terhadap jenazah selayaknya dilakukan pengawetan yang dapat langsung dilakukan setelah pemeriksaan luar jenazah (**Atmadja dan Untoro**, 2008).

Persoalan warisan, paternitas dan aksi kriminal dapat terjadi pada jenazah yang terformalin tersebut. Untuk menyelesaikan kasus-kasus tersebut, maka perlu ditempuh analisis *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA) dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR), sebab hanya dengan metode ini DNA yang terdegradasi masih dapat dianalisis.

Pengambilan sampel jaringan lunak relatif lebih mudah dilakukan dan tidak banyak melukai jenazah, meskipun sampel yang lain juga dapat diambil, akan tetapi menurut adat dan pranata sosial di Indonesia yang menganjurkan untuk tidak melukai jenazah atau jika terpaksa, diharapkan

sedikit mungkin melukai jenazah, sehingga sampel awal yang dipergunakan adalah dari jaringan lunaknya.

Sampel yang sudah terpapar formalin, mempunyai kendala ketidakberhasilan dalam analisis DNANYa. Hal ini disebabkan karena pH larutan formalin yang semakin turun seiring waktu karena terbentuknya asam formiat, menyebabkan bertambahnya *AP Site* yang berakhir dengan fragmentasi DNA (**Evans and Thomas**, 2007). Pada kondisi normal (kondisi fisiologis) ikatan yang paling labil pada struktur DNA adalah ikatan N-glikosil yang mengikat basa. Hidrolisis pada ikatan tersebut mengakibatkan hilangnya basa yang meninggalkan lokasi apuridik atau apirimididik (*AP Site*), lokasi tersebut sering berlanjut dengan 'retakan' pada struktur DNA.

Pada penelitian **Wilianto** (2010) menunjukkan analisis DNA jaringan lunak manusia yang terpapar larutan formalin 2% sampai dengan 35% selama 3 hari, didapatkan visualisasi hasil PCR lokus CSF1PO dan *miniprimer* lokus D3S818 tidak memperlihatkan pita DNA. Sedangkan *miniprimer* lokus D13S317 dan D21S11 masih dapat memperlihatkan pita DNA, sehingga dapat membantu keberhasilan proses penentuan identifikasi seseorang dalam pemeriksaan DNA paternitas maupun dalam pemeriksaan DNA forensik lainnya.

Sampai saat ini belum ada penelitian yang mengungkapkan analisis DNA dari sampel jenazah terlantar yang terpapar formalin sampai dengan 6 bulan, sesuai dengan prosedur yang ada di laboratorium anatomi yang menyimpan jenazah terlantar dari pihak rumah sakit, jika dalam jangka waktu 6 bulan ada pihak keluarga yang datang, maka jenazah dapat diserahkan.

Melihat kondisi diatas, maka penelitian tentang analisis DNA dari sampel jaringan lunak manusia yang sudah terformalin beberapa waktu, masih sangat relevan dilakukan. Pola polimorfisme DNA inti yang lazim digunakan untuk identifikasi ialah *Short Tandem Repeat* (STR) dan dengan menggunakan tiga belas lokus STR identitas individu secara umum dapat ditentukan. Ukuran fragmen STR biasanya tidak lebih dari 500 bp, oleh karena itu STR dapat diamplifikasi dengan menggunakan jumlah DNA templat yang relatif sedikit (~1ng) dan juga dapat digunakan untuk menganalisa sampel DNA yang sudah terdegradasi.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis jaringan lunak manusia yang telah dilakukan pengawetan selama 6 bulan dengan interval 1 bulan terhadap DNA-nya. Hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu memecahkan berbagai kasus forensik yang melibatkan pemeriksaan DNA dengan spesimen yang terdegradasi akibat formalin.

MATERI DAN PENELITIAN

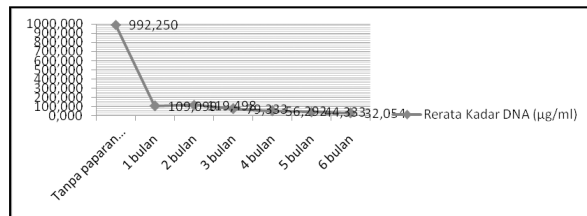
Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan sampel DNA inti yang berasal dari jaringan lunak manusia bagian muskulus psoas mayor yang diambil dari satu jenazah terlanter di Instalasi Ilmu Kedokteran Forensik RSUD Dr Soetomo Surabaya dengan kriteria secara makroskopis tidak menampakkan tanda pembusukan.

Instrumen yang dipergunakan dalam penelitian ini: *shaker* (VRN 200), *ultrasonic homogenizer* (seri 4710), *spektrofotometer UV-UV visible* (Shimadzu 1601), *thermal cycler* (Perkin Elmer 2400) dan *elektroforesis unit*.

Urutan dan ukuran produk PCR yang dipergunakan (Promega corp, 2001): D13S317 5'-ATTACAGAAGTCTGGGATGTGGAGGA-3' 5'-GGCAGCCCCAAAAGACAGA-3' 193-237 bp.

Program untuk lokus D13S317: *Initial denaturation* 96° C-1', *denaturation* 94° C-30'', *annealing* 60° C-30'', *extension* 70° C-45'', *cycle* 10 ×, *denaturation* 90° C-30'', *annealing* 60° C-30'', *extension* 70° C-45'', *cycle* 30 × *final ext*: 60° C-30''.

HASIL DAN DISKUSI



Grafik 1. Penurunan rerata kadar DNA jaringan lunak manusia yang terpapar formalin interval waktu 1 bulan sampai 6 bulan.

Hasil analisis menunjukkan semakin lama waktu paparan formalin yang diberikan pada sampel jaringan lunak manusia, maka terdapat kecenderungan kadar DNA yang semakin menurun tetapi masih berada pada nilai ambang minimal kadar DNA yang dibutuhkan pada pemeriksaan *Short Tandem Repeat* (STR).

Tabel 1. Hasil uji *one way ANOVA*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.053	6	.009	641.010	.000
Within Groups	.000	21	.000		
Total	.053	27			

Pada uji *one way ANOVA* diperoleh nilai $p = 0,000$ yang berarti "paling tidak terdapat perbedaan kadar DNA yang bermakna pada dua waktu paparan". Untuk mengetahui waktu paparan mana yang terdapat perbedaan bermakna, maka dilakukan analisis *Post Hoc*.

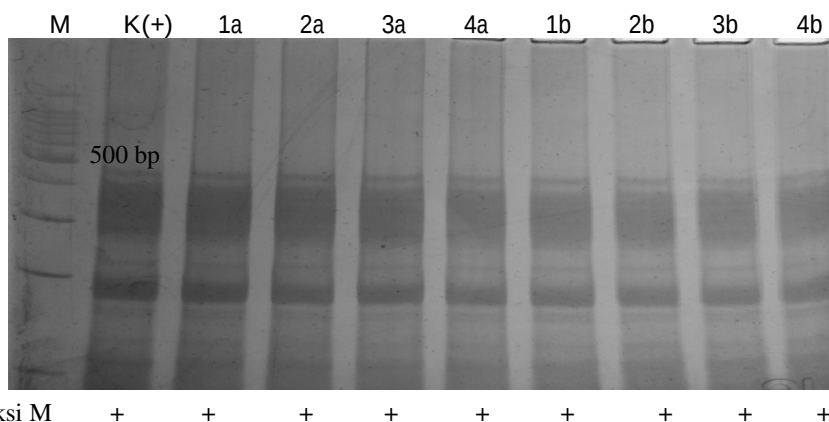
Tabel 2. Hasil analisis *Post Hoc*

Waktu Paparan	X ± SD (µg/ml)
0 bulan	992,25 ± 99,71 ^{a,b,c,d,e,f,g}
1 bulan	109,1 ± 16,85 ^{a,b,d,e,f,g}
2 bulan	119,49 ± 4,83 ^{a,c,d,e,f,g}
3 bulan	79,33 ± 0,95 ^{a,b,c,d,e,f,g}
4 bulan	56,29 ± 3,48 ^{a,b,c,d,e,f,g}
5 bulan	44,33 ± 1,65 ^{a,b,c,d,e,f,g}
6 bulan	32,05 ± 1,61 ^{a,b,c,d,e,f,g}

Ket:

X: rerata kadar DNA, SD: Standar Deviasi

Tanda ^{a,b,c,d,e,f,g}: huruf yang sama pada setiap lajur menunjukkan kesamaan hasil signifikan dari analisis *Post Hoc*



Keterangan :

1a-4a : sampel 1 bulan

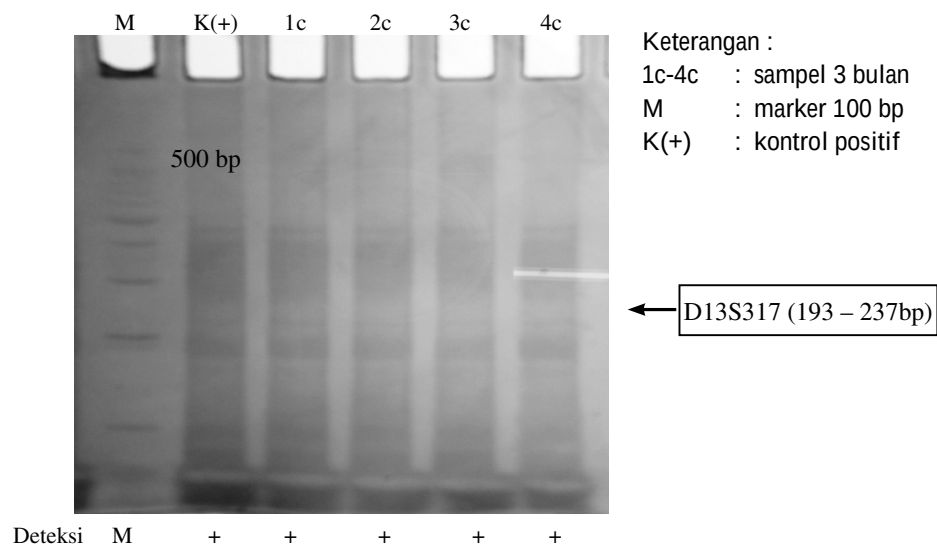
1b-2b : sampel 2 bulan

M : marker 100 bp

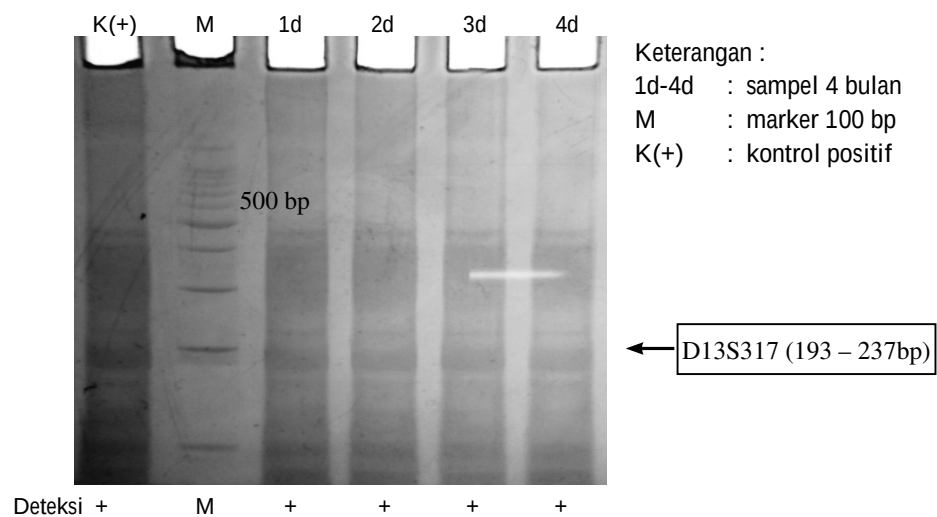
K(+) : kontrol positif

← D13S317 (193 – 237bp)

Gambar 1. Hasil amplifikasi STR lokus D13S317.



Gambar 2. Hasil amplifikasi STR lokus D13S317.



Gambar 3. Hasil amplifikasi STR lokus D13S317.

Hasil analisis *Post Hoc* pada *tabel 2* menunjukkan hasil $p < 0,05$, kecuali waktu paparan 1 bulan dengan 2 bulan $p = 0,081$. Sehingga dapat diambil kesimpulan terdapat perbedaan kadar DNA secara bermakna pada semua waktu paparan kecuali waktu paparan 1 bulan dengan 2 bulan.

Hasil Visualisasi DNA Lokus D13S317

Visualisasi hasil PCR dari DNA jaringan lunak manusia yang terpapar formalin interval 1 bulan selama 6 bulan dengan elektroforesis pada lokus D13S317, sebagai berikut:

Gambar 1 menunjukkan hasil amplifikasi PCR pada lokus D13S317 terhadap sampel DNA jaringan lunak

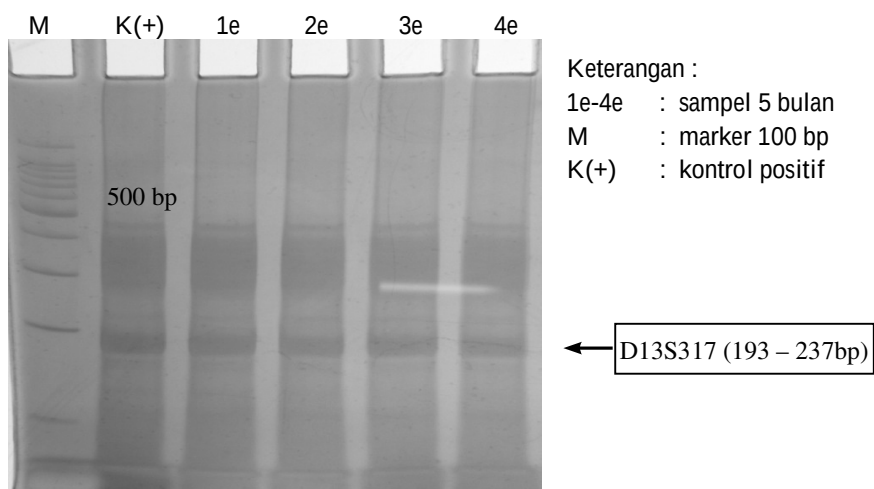
manusia pada waktu 1 bulan dan 2 bulan masih nampak band/pita.

Gambar 2 menunjukkan hasil amplifikasi PCR pada lokus D13S317 terhadap sampel DNA jaringan lunak manusia pada waktu 3 bulan masih nampak band/pita.

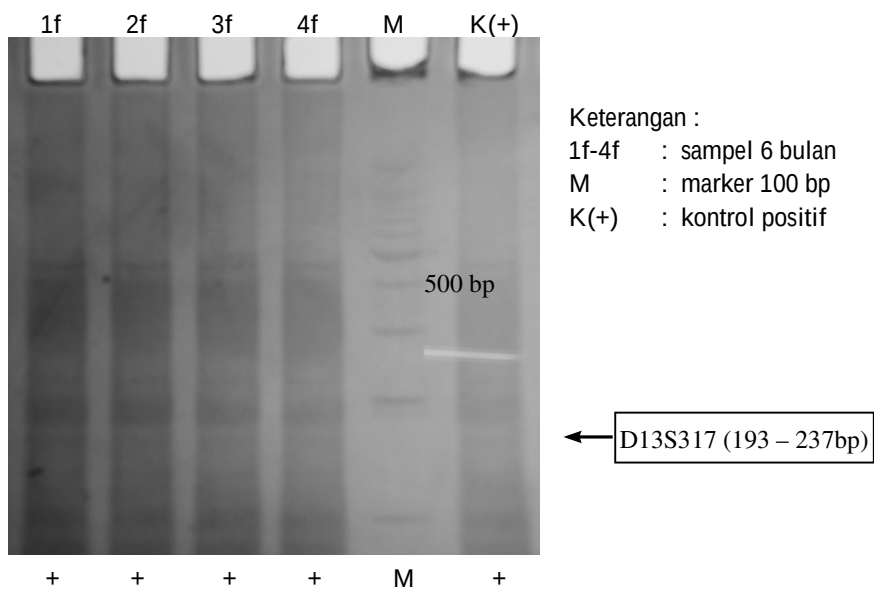
Gambar 3 menunjukkan hasil amplifikasi PCR pada lokus D13S317 terhadap sampel DNA jaringan lunak manusia pada waktu 4 bulan masih nampak band/pita.

Gambar 4 menunjukkan hasil amplifikasi PCR pada lokus D13S317 terhadap sampel DNA jaringan lunak manusia pada waktu 5 bulan masih nampak band/pita.

Gambar 5 menunjukkan hasil amplifikasi PCR pada lokus D13S317 terhadap sampel DNA jaringan lunak manusia pada waktu 6 bulan masih nampak band/pita.



Gambar 4. Hasil amplifikasi STR lokus D13S317.



Gambar 5. Hasil amplifikasi STR lokus D13S317.

Tabel 3. Hasil deteksi DNA jaringan lunak manusia yang terpapar formalin dengan pemeriksaan STR PCR lokus D13S317

Perlakuan	Terdeteksi	Tidak terdeteksi
Tanpa perlakuan	4	0
1 bulan	4	0
2 bulan	4	0
3 bulan	4	0
4 bulan	4	0
5 bulan	4	0
6 bulan	4	0

Tabel di atas menunjukkan bahwa seluruh sampel DNA jaringan lunak manusia yang terpapar formalin interval 1 bulan selama 6 bulan masih dapat terdeteksi dengan baik dengan pemeriksaan *Short Tandem Repeat* (STR) lokus D13S317. Ukuran produk PCR (bp) untuk lokus D13S317 adalah 193–237 bp.

Hasil Pengukuran Kadar dan Kemurnian DNA

Kemurnian DNA menjadi persyaratan dalam pemeriksaan *Polimerase Chain Reaction* (PCR) dimana kemurnian DNA 1-2 (ideal 1,8-2) memungkinkan dilakukan

amplifikasi. Penelitian ini mendapatkan hasil kadar DNA yaitu berkisar 30.333–1127 dan kemurnian DNA berkisar 1.076–1.988. Dengan demikian kemurnian DNA yang didapat sudah bagus dan memungkinkan untuk dipergunakan dalam amplifikasi PCR.

Rerata kadar yang didapat pada jaringan lunak manusia yang tidak terpapar formalin sebesar 992.250 µg/ml. Menurun drastis setelah paparan formalin selama 1 bulan yang menunjukkan rerata kadar sebesar 109.099 µg/ml. Semakin lama waktu paparan formalin yang diberikan pada sampel jaringan lunak manusia, maka terdapat kecenderungan kadar DNA yang semakin menurun.

Kadar DNA merupakan faktor penting dalam pemeriksaan DNA forensik yakni berpengaruh terhadap keberhasilan STR-PCR pada sampel-sampel DNA. Penurunan kadar DNA hingga 1 ng berpotensi terhadap penurunan kemampuan deteksi STR hingga 95% (Sosiawan, 2007).

Jumlah kadar DNA yang dibutuhkan dalam analisis DNA forensik berbeda-beda tergantung dari kebutuhan dan jenis pemeriksaan. Pada pemeriksaan *Short Tandem Repeat* (STR) hanya membutuhkan konsentrasi DNA minimal antara 1–25 ng. Selain tergantung dari kadar DNA dari bahan pemeriksaan juga dibutuhkan kualitas DNA yang mencukupi yaitu DNA yang digunakan harus dalam kondisi terdegradasi seminimal mungkin (Kusuma dan Yudianto, 2010). Apabila DNA dalam kondisi terdegradasi parah, maka dapat mengakibatkan primer tidak dapat menempel pada DNA target yang akan digandakan (Sosiawan, 2007).

Degradasi DNA pada jenazah dapat disebabkan oleh 2 faktor, yaitu endogenous dan exogenous. Faktor endogenous berasal pada sel sendiri, yang juga dikenal sebagai kerusakan spontan. Faktor exogenous berasal dari lingkungan.

Perusakan postmortem pada tubuh manusia adalah proses yang sangat kompleks, dimulai dengan autolysis dan pembusukan serta diikuti oleh penguraian aerobik dan bakterial (pembusukan) dari bahan organik.

Faktor lingkungan seperti halnya kelembaban serta temperatur lingkungan sangatlah berpengaruh terhadap kondisi DNA yang digunakan sebagai bahan identifikasi DNA di bidang forensik, sebagaimana pada pemeriksaan DNA di bidang lainnya (Sosiawan, 2007).

Penelitian ini mempergunakan paparan formalin pada jaringan lunak manusia interval 1 bulan selama 6 bulan, sehingga dapat berdampak terjadinya penurunan kadar DNA pada jaringan lunak manusia tersebut. Hal ini disebabkan oleh karena pH larutan formalin yang semakin

turun seiring waktu karena terbentuknya asam formiat, menyebabkan bertambahnya *AP Site* yang berakhir dengan fragmentasi DNA (Evans and Thomas, 2007). Pada kondisi normal (kondisi fisiologis) ikatan yang paling labil pada struktur DNA adalah ikatan N-glikosil yang mengikat basa. Hidrolisis pada ikatan tersebut mengakibatkan hilangnya basa yang meninggalkan lokasi apurinik atau apirimidinik (*AP Site*), lokasi tersebut sering berlanjut dengan ‘retakan’ pada struktur DNA.

Pada penelitian ini didapatkan penurunan kadar tetapi masih berada pada nilai ambang minimal kadar DNA yang dibutuhkan pada pemeriksaan *Short Tandem Repeat* (STR) dimana didapatkan rerata kadar DNA berurutan interval 1 bulan selama 6 bulan: 109.099 µg/ml, 119.498 µg/ml, 79.333 µg/ml, 56.292 µg/ml, 44.333 µg/ml dan 32.054 µg/ml.

Hasil Analisis Data Kuantitatif

Pengaruh waktu paparan formalin terhadap DNA jaringan lunak manusia secara bermakna dapat diketahui dengan uji *one way ANOVA*. Penelitian ini memperoleh hasil uji statistik dengan uji *one way ANOVA*, diperoleh hasil $p = 0,000$ ($p < 0,05$) yang berarti ”paling tidak terdapat perbedaan kadar DNA yang bermakna pada dua waktu paparan”. Dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc* untuk mengetahui waktu paparan mana yang terdapat perbedaan bermakna, mendapatkan hasil: semua waktu paparan dengan waktu paparan yang lain $p = 0,000$ ($p < 0,05$), kecuali waktu paparan 1 bulan dengan 2 bulan $p = 0,081$. Dengan demikian perbedaan kadar DNA berbeda secara bermakna pada semua waktu paparan kecuali waktu paparan 1 bulan dengan 2 bulan, sehingga dengan kata lain hipotesis yang menyebutkan ada pengaruh paparan formalin dengan interval waktu 1 bulan selama 6 bulan terhadap DNA jaringan lunak manusia diterima.

Hasil Visualisasi DNA

Hasil visualisasi DNA dianalisis secara deskriptif, yakni dengan melihat ada tidaknya gambaran pita atau band sesuai dengan ukuran produk PCR (base pair) masing-masing lokus dan setingkat dengan kontrol positif yang berasal dari jaringan lunak muskulus psoas mayor jenazah tersebut tanpa paparan formalin.

Hasil visualisasi DNA jaringan lunak manusia yang terpapar formalin interval 1 bulan selama 6 bulan pada lokus D13S317 dalam penelitian ini dapat terdeteksi. Hal ini membuktikan bahwa lokus D13S317 merupakan lokus yang potensial untuk identifikasi forensik. Penurunan kadar DNA pada jaringan lunak manusia yang terpapar

formalin tersebut tidak menimbulkan efek yang berarti, yang menyebabkan DNA jaringan lunak manusia tersebut kehilangan kemampuannya sebagai bahan identifikasi DNA forensik.

SIMPULAN

Hasil analisis identifikasi DNA dalam penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Ada pengaruh paparan formalin dengan interval waktu 1 bulan selama 6 bulan terhadap kadar DNA jaringan lunak manusia ($p = 0,000$, $p < 0,05$), yakni semakin lama waktu paparan formalin yang diberikan maka menurun pula kadar DNA yang ada.
2. Tidak ada pengaruh paparan formalin dengan interval waktu 1 bulan selama 6 bulan terhadap DNA jaringan lunak manusia pada lokus D13S317 dengan metode STR PCR. Hasil visualisasi DNA semua dapat terdeteksi.

DAFTAR PUSTAKA

- Astiti W**, 2010. Blog Kesehatan Harta Paling Berharga, sulit cari mayat untuk cadaver, Bali, diakses 2 Januari 2011.
- Atmadja DS dan Untoro E**, 2008. Peranan Analisis DNA pada Penanganan Kasus Forensik, Penerapan Ilmu Kedokteran Forensik dalam Proses Penyidikan, Jakarta, hal: 219–228.
- Evans and Thomas C**, 2007. *DNA Damage, The Major Cause of Missing Pieces From the DNA Puzzle*, New England Biolabs Inc.
- Kusuma SE dan Yudianto A**, 2010. Forensik Molekuler, dalam Buku Ajar Ilmu Kedokteran Forensik dan Medikolegal, edisi keenam, Ed. Hariadi A, Hoediyanto. Departemen Ilmu Kedokteran Forensik dan Medikolegal Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya, hal: 333–335 dan 359–370.
- Sosiawan A**, 2007. Analisis efek paparan panas suhu ekstrim tinggi terhadap DNA yang berasal dari tulang dan gigi. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Wilianto W**, 2010. Pengaruh Paparan Formalin Secara Prosentase Terhadap DNA Muskulus Psoas Mayor dengan Pemeriksaan Metode PCR Lokus CSF1P0, D5S818, D13S317, D21S11, Dept/Inst. Ilmu Kedokteran Forensik dan Medikolegal FK Unair-RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
- Yudianto A**, 2010. Analisis DNA Tulang dan Gigi pada Lokus *Short Tandem Repeat-Combined DNA Index System* (STR-Codis), *Y-Chromosome STRs* dan *Mitochondrial DNA* (mtDNA) Akibat Paparan Panas Suhu Tinggi, Disertasi pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.