

TEKNIK ANALISIS DNA DALAM MENGIDENTIFIKASI GENOTIP GOLONGAN DARAH PADA JENAZAH KASUS FORENSIK

Taufik Suryadi

Abstrak: Pada beberapa kasus forensik, penting sekali identifikasi golongan darah dalam kaitannya dengan kecocokan golongan darah pada barang bukti korban atau pelaku. Dalam hal identifikasi korban, seringkali tidak dapat ditegakkan melalui metode konvensional, sehingga diperlukan cara identifikasi forensik melalui analisis DNA. Teknik analisis DNA yang digunakan dalam genetika modern banyak menggunakan petanda genetik sebagai alat bantu identifikasi genotip suatu individu. Petanda genetik, biasa juga disebut dengan petanda atau *marker*, merupakan ekspresi pada individu yang terlihat oleh mata atau terdeteksi dengan alat tertentu, yang menunjukkan dengan pasti genotip suatu individu. Aplikasi petanda genetik sangat luas, khususnya dalam bidang medis (kedokteran) dan kepolisian dalam melakukan proses identifikasi. (JKS 2015; 3: 157-161)

Kata kunci : Kasus forensik, golongan darah, analisis DNA

Abstract. *In some forensic cases, blood group identification is important in relation to the suitability of blood group on the evidence of the victim or the perpetrator. In terms of identification of the victim often cannot be enforced through conventional methods, so that the necessary means of forensic identification through DNA analysis. DNA analysis technique used in many modern genetics using genetic markers as tools genotypic identification of an individual. Genetic markers, also called markers or marker, is an expression of the individual that is seen by the eye or detectable by a particular tool, which shows exactly genotype of an individual. Genetic markers, also called markers or marker, is an expression of the individual that is seen by the eye or detectable by a particular tool, which shows exactly genotype of an individual. Application of genetic markers is very broad, especially in the medical field (medicine) and police in the identification process.* (JKS 2015; 3: 157-161)

Key word : Forensic cases, blood group, DNA analysis

Pendahuluan

Golongan darah merupakan salah satu indikator identitas seseorang. Pada orang hidup, golongan darah sering digunakan untuk kepentingan transfusi dan donor serta untuk identifikasi personal, pada orang yang sudah meninggal, kegunaan golongan darah lebih tertuju pada identifikasi.¹ Pada beberapa kasus kriminal dan non kriminal misalnya kasus ragu keturunan (*disputed parentage*), golongan darah bisa menjadi petunjuk identitas seseorang.² Pada beberapa kasus kematian dengan barang bukti berupa bercak darah, identifikasi golongan darah ini penting sekali dalam kaitannya dengan kecocokan

golongan darah pada barang bukti korban atau pelaku karena golongan darah memberikan data identitas yang spesifik.³ Bias hasil pemeriksaan golongan darah akan sangat merugikan bagi suatu proses peradilan.⁴ Pada identifikasi korban yang telah membusuk ataupun hangus terbakar, sering sekali identifikasi forensik tidak dapat ditegakkan melalui metode konvensional, sehingga diperlukan cara identifikasi forensik lainnya yaitu melalui analisis DNA.⁵ Penentuan golongan darah pada bercak darah yang sudah kering, sudah lama ataupun jenazah yang sudah membusuk dimungkinkan karena antigen yang terdapat pada permukaan sel tetap utuh walaupun sel-selnya telah hancur, dengan demikian penetapan golongan darah melalui DNA tetap dapat dilakukan.^{6,7}

Taufik Suryadi adalah Dosen Bagian Kedokteran Forensik Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala/RSUD dr. Zainoel Abidin Banda Aceh

Teknik analisis DNA yang digunakan dalam genetika modern banyak menggunakan petanda genetik sebagai alat bantu identifikasi genotip suatu individu.⁸ Petanda genetik, biasa juga disebut dengan petanda atau *marker*, merupakan ekspresi pada individu yang terlihat oleh mata atau terdeteksi dengan alat tertentu, yang menunjukkan dengan pasti genotip suatu individu. Aplikasi petanda genetik sangat luas, khususnya dalam bidang medis (kedokteran) dan kepolisian dalam melakukan proses identifikasi.⁹ Kepentingan pemeriksaan DNA adalah mengetahui genotipnya.⁵ sehingga didapatkan hasil yang lebih spesifik karena dapat menentukan alel homozigot atau heterozigot dari seseorang dengan hasil identifikasi lebih akurat.¹⁰

Metode Analisis DNA

Cara kerja analisis DNA menggunakan prinsip reaksi menentukan genotip golongan darah pada jenazah melalui metode *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) yaitu amplifikasi fragmen DNA serta restriksi dengan enzim Kpn I dan Alu I.¹¹ Tujuan PCR-RFLP adalah mengamplifikasi susunan nukleotida gen ABO yang menyandi aktivitas enzim glikosiltransferase

untuk menentukan antigen A dan B (enzim glikosiltransferase A dan glikosiltransferase B). Bila tidak ada aktivitas enzimatis maka terbaca O. Bila terdapat gen H yang menyandi fucosiltransferase maka O *bombay* dapat ditemukan.¹¹ Setelah itu dilakukan isolasi/ekstraksi DNA dengan prosedur standar yaitu ekstraksi organik yang disebut juga ekstraksi *fenol-kloroform*.⁸ Sampel-sampel DNA yang telah dipersiapkan diamplifikasi dengan dua set primer yaitu primer 261 dan primer 703. Pasangan primer pertama yang meliputi primer ABO-1 (261 F) dan ABO-2 (261 R) dipergunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA sepanjang 200 bp termasuk didalamnya nukleotida 261.¹² Pasangan primer kedua yang meliputi primer ABO-3 (703 F) dan ABO-4 (703 R) dipergunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA sepanjang 128 bp termasuk didalamnya nukleotida 703.^{12,13}

Aplikasi PCR-RFLP untuk menganalisis posisi nukleotida c-DNA 261 dan 703 dari transferase A pada sampel darah jenazah untuk menentukan genotip ABO. Primer yang digunakan adalah pasangan primer 261 dan 703 dengan susunan nukleotida tampak pada tabel 1.¹¹⁻¹⁴

Tabel 1. Sekuens primer yang digunakan untuk amplifikasi gen ABO

Primer	Target fragmen DNA	Sekuens	Panjang
ABO-1	199 atau 200 bp	5-CACCGTGGAAGGATGTCCTC-3	20
ABO-2		5-AATGTCCACAGTCACTCGCC-3	20
ABO-3	128bp	5-TGGAGATCCTGACTCCGCTG-3	20
ABO-4		5- GTAGAAATCGCCCTCGTCCTT-3	21

Amplifikasi dilakukan dalam 100uL campuran reaksi yang mengandung 50 ng DNA yang telah diekstraksi., 10 uL buffer reaksi PCR (konsentrasi akhir 10mM Tris-HCl, pH 8,3 pada suhu 25 derajat celsius, 50 mM KCl, 3,5 mM MgCl₂ dan 0,1% wt/vol gelatin), 200uM setiap dNTP, 2 unit ampli-taq gold DNA polimerase, dan 15 pmol untuk masing-masing set primer. Total 35 siklus masing-masing amplifikasi

dilakukan, dengan kondisi suhu berbeda setiap set primer.¹² Denaturasi primer ABO-1 (261F) dan ABO-2 (261R) dilakukan selama 2 menit dengan suhu 94 derajat celsius, proses *annealing* selama 2 menit pada suhu 55 derajat celsius, dan ekstensi selama 3 menit pada suhu 72 derajat celsius.¹² Untuk primer ABO-3 (703F) dan ABO-4 (703R), proses denaturasi dilakukan selama 2 menit pada

suhu 94 derajat celsius, proses annealing primer selama 2 menit pada 58 derajat celsius, dan ekstensi selama 3 menit pada suhu 72 derajat celsius. Produk amplifikasi kemudian dicek dengan elektroforesis dalam 2% gel agarose selama 2 jam pada 150 V dan visualisasi langsung produk tersebut dengan ethidium bromida di bawah sinar UV.^{12,13}

Analisis RFLP

Produk amplifikasi primer ABO-1 (261F) + ABO-2 (261R) dipotong (restriksi) dengan enzim *KpnI*, dan produk amplifikasi primer ABO-3 (703F) + ABO-4(703R) dipotong dengan enzim *AluI*.¹⁴ Sepuluh mikroliter dari setiap produk PCR yang sudah diamplifikasi dipotong dengan enzim *KpnI* atau *AluI* selama 1 jam. Amplifikasi DNA yang dipotong kemudian diolah dalam 3% Nusieve 3:1 gel agarose dengan buffer TBE (0,89 M tris-HCl, 0,089 M borat, 0,002 M EDTA, pH 8,0) pada 50 V selama 1 jam. Gel dicampur selama 15 menit dalam 0,5 ug/ml ethidium bromida, dan pita dapat divisualisasikan dengan sinar UV. *DNA ladder* 50 bp digunakan sebagai *marker* untuk memperkirakan ukuran fragmen.^{11,12}

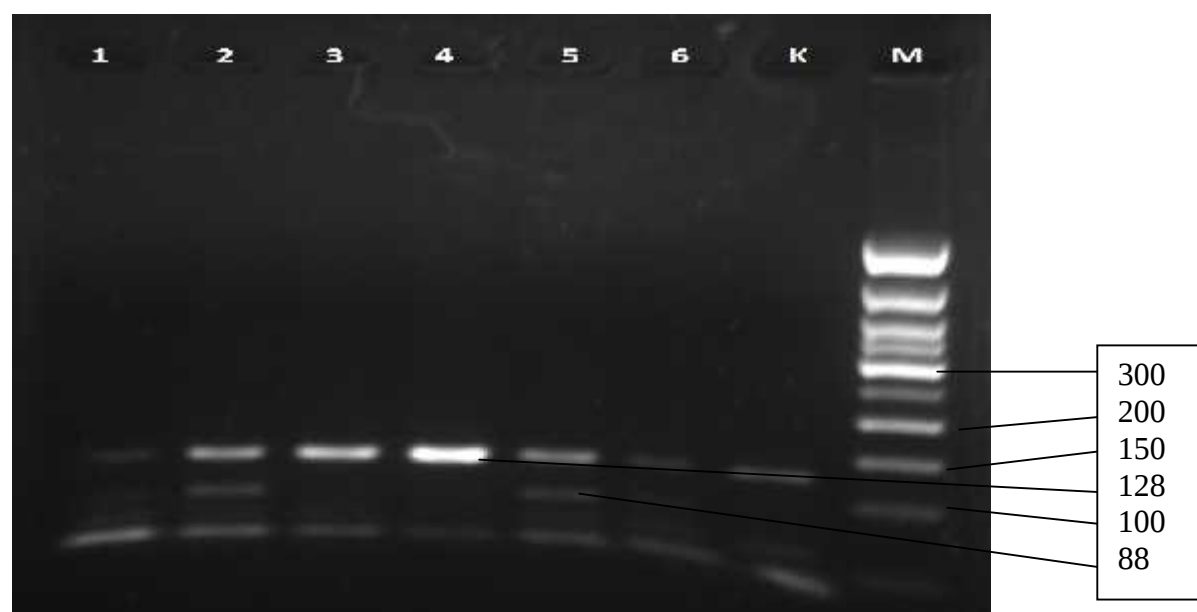
Restriksi enzim *KpnI* berfungsi mendeteksi adanya *delesi* nukleotida 261 (G→-) yang mendeteksi alel O.^{12,14,15} Restriksi enzim *AluI* berfungsi mendeteksi adanya pertukaran nukleotida pada posisi 703 (G→A) yang mendeteksi alel B.¹⁵ Primer ABO-1 dan ABO-2 mengamplifikasikan fragmen DNA sepanjang 200-bp (nt 233-432) yang mengandung posisi nukleotida 261 c-DNA dari bagian ABO. Pada produk PCR alel spesifik O 199 bp terdapat *delesi* pada nukleotida nomor 261, *delesi* tersebut yang akan menjadi target pemotongan enzim *KpnI*. Jika terdapat nukleotida G pada posisi 261 maka fragmen menjadi 200 bp, dan target pemotongan enzim *KpnI* hilang.¹²⁻¹⁵

Pemotongan dengan enzim *KpnI* akan menghasilkan fragmen 171- dan 28-bp, dengan fragmen 171-bp digunakan sebagai sebuah tanda alel O. Jika kedua alel tersebut terpotong dikenal sebagai homozigot OO. Apabila alel hanya setengah yang terpotong yaitu pada satu alel tidak terpotong tetap fragmennya 200-, dan alel yang lainnya terpotong menjadi 171-, dan 28-bp maka yang ditemukan heterozigot AO atau BO. Jika tidak ada yang terpotong, maka tidak ada alel O yang dikonfirmasi dan kemungkinan genotip AA, AB dan BB.^{12,13,15}

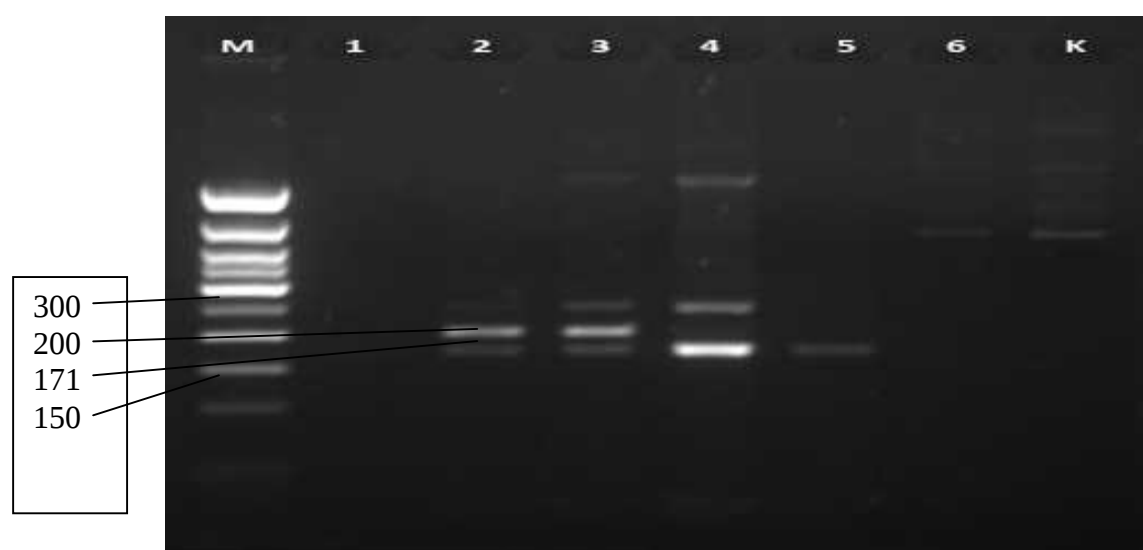
Primer ABO-3 dan ABO-4 mengamplifikasi fragmen DNA sepanjang 128-bp (nt 663-790) yang mengandung nukleotida posisi 703 dari lokus ABO. Jika nukleotida 703 adalah Adenin (A), fragmen ini menunjukkan alel B spesifik, dan akan menjadi target pemotongan enzim *AluI*.^{12,13} Jika kedua alel ini dipotong dengan lengkap oleh enzim *AluI* akan menghasilkan pita-pita 88 dan 40-bp dan dikenal sebagai homozigot BB. Fragmen 88-bp tersebut digunakan sebagai sebuah tanda alel B. Jika alel ini hanya setengah yang terpotong dari fragmen 128-, 88-, dan 40-bp ditemukan menjadi AB atau BO. Jika tidak ada yang terpotong dengan enzim *AluI*, maka tidak ada alel B, dan kemungkinan genotip AA, AO dan OO. Bila dikombinasikan kedua restriksi di atas, jika tidak ada yang dipotong baik oleh enzim *KpnI* maupun *AluI* pada fragmen 200-bp maupun 128-bp maka hal tersebut mengindikasikan tidak ada alel O dan B, sehingga dianggap homozigot alel A.^{12,13} Golongan darah dari 6 genotip ABO utama dapat ditentukan dari pembacaan pita-pita DNA seperti tampak pada tabel 2 dan gambar 1 serta gambar 2.^{11, 12,15}

Tabel 2. Bentuk fragmen restriksi yang terlihat setelah digesti dari produk PCR¹¹⁻¹⁴

No.	Genotip ABO	Kpn I	Alu I	Fenotip
1.	A	200	128	A
2.	B	200	88,40	B
3.	O	171, 28	128	O
4.	AA	200	128	A
5.	BB	200	88, 40	B
6.	AO	200, 171, 28	128	A
7.	BO	200,171,28	128,88,40	B
8.	OO	171, 28	128	O
9.	AB	200	128,88, 40	AB



Gambar 1. Hasil elektroforesis produk PCR dengan primer 703 setelah direstriksi dengan enzim Alu I nomor sampel DNA no.1-6 (*DNA ladder marker 50 bp*)



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk PCR dengan primer 261 setelah direstriksi dengan enzim Kpn I nomor sampel DNA no.1-6 (*DNA ladder marker 50 bp*)

Kesimpulan

Analisis DNA untuk mengidentifikasi golongan darah sangat penting dilakukan mengingat ketepatan metode ini mendekati 100%. Dalam penyelidikan kasus jenazah forensik, analisis DNA dapat digunakan walaupun sampelnya sedikit, sudah sangat lama, ataupun jenazah yang sudah membusuk. Metode analisis DNA pada dasarnya sama dengan teknik biomolekuler lain yang biasa menggunakan metode PCR-RFLP.

Daftar Pustaka

1. Kominato Y, Hata Y, Matsui K, Takizawa H. Regulation of ABO gene expression. *Legal medicine*, 2005, vol 7 issue 4, p. 263-5.
2. Michino J, Hata Y, Matsui K., Takizawa H, Kominato Y, Tabata S, et al. Demonstration of A antigen and A allele of ABO histo-blood in nail in case with the absence of A antigen and anti-A antibody in blood. *Legal medicine*, 2005; 7 (3): 194-7.
3. Dahlan S. Ilmu kedokteran forensik pedoman bagi dokter dan penegak hukum. Balai penerbit Universitas Diponegoro. Semarang. 2000.
4. Gizela BA. Uji laboratorium golongan darah manusia dengan proses degradasi proteolitik. *Berkala Ilmu Kedokteran*, 2005; 37(1):7-11.
5. Yudianto A, Kusuma SE. Pola pemetaan lokus DNA inti dalam pemeriksaan sampel identifikasi forensik dengan metode polimerase chain reaction pada lokus CSF1PO, THO1 dan TPOX. *Majalah Kedokteran Forensik Indonesia, Pro Justisia*, vol 11, no.4 Oktober-Desember 2009:1-16.
6. Nishi K, Nakagawa T, Yamamoto A, Yamasaki S, Yamamoto Y, Kobayashi A. ABO Blood Typing from Forensic Materials - Merits and demerits of detection methods utilized in our laboratories, and biological significance of the antigens. 2005. Available from: http://www.geradts.com/anil/ij/vol_006_no_002/papers/paper001.
7. Idries AM, Tjiptomartono AL. Penerapan ilmu kedokteran forensik dalam proses penyidikan. Sagung seto, Jakarta. 2008.
8. Butler JM. Forensic DNA typing, Biology, technology and genetics of STR markers. Second edition. Elsevier academic press. London. 2005.
9. Currant WJ, Mc Garry AL, Patty CS. Modern legal medicine, psychiatry and forensic science. FA Davis company, Philadelphia. 1980.
10. Ishida K, Zhu BL, Sakoda S, Quan L, Oritani S, Fujita M, et al. Significance of DNA analysis for determination of ABO blood groups from hair and nail of decomposed human remains: a comparison with phenotyping by the absorption elution method. *Legal medicine*; 2000; 2(2):212-5.
11. Al-Bustan S, El-Zawahri M, Al-Azmi D, Al-Bashir AA. Allele Frequencies and Molecular Genotyping of the ABO Blood Group System in a Kuwaiti Population. *International Journal of Hematology*, Oktober 2001.
12. Al-Meri QM, Zaidan HK, Al-Saadi AH, Ewadh MJ. Genotyping of forensic DNA sample, determining ABO blood group. *IJABR Vol 2(1) 2012*: 72-6.
13. Ohmori T, Sato H. The optimum elution temperatur and time in absorption elutin test using commercially vailabel monoclonal antibodies for ABO blood typing from hair samples. *National Research Institute of Police Science*, 2001; 6(1): 49-55.
14. Hanania SS, Hassawi DS, Irshaid ND. Allele Frequency and Molecular Genotyping of the ABO Blood Group System in a Jordanian Population. *J.Med.Sci*, 2007; 7(1): 51-8.
15. Ciesielka M, Koziol P, Madro R. Genotyping of ABO Group Allele in Bloodstains by the PCR-RFLP Technique. *Z ZagadnienNauk Sqdowich z XLVIII*: 2001;53-64.