

# Identifikasi Pelaku Kejahatan antara Kembar Identik dengan Menggunakan Teknologi *Next-Generation Sequencing*

Ari Sri Wulandari

Fakultas Kedokteran IPB *University*

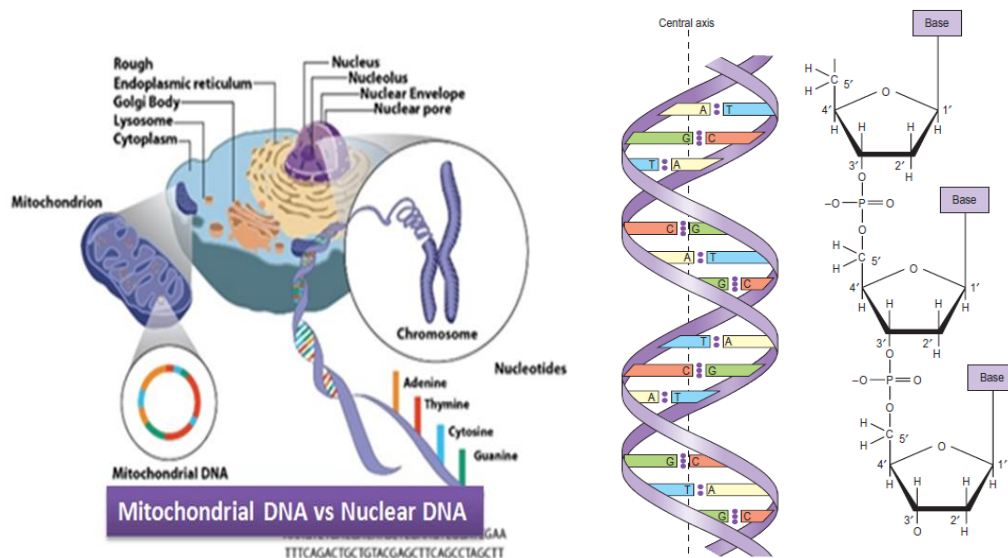
Teknik identifikasi DNA adalah salah satu aspek bioteknologi yang kini telah menjadi fitur fenomenal setelah difungsikan untuk menyelesaikan berbagai kasus forensik dan sengketa paternitas yang tidak dapat diatasi menggunakan teknik yang sebelumnya banyak digunakan, oleh karena itu identifikasi DNA dikenal luas dan cepat oleh kalangan ilmuwan, kedokteran, maupun masyarakat awam.<sup>1</sup> Identifikasi korban dan tersangka dalam suatu kasus kriminal termasuk penentuan hubungan keluarga merupakan obyek utama untuk analisa DNA forensik yang mengandalkan ciri spesifik individu pada gen yang berbeda dari setiap orang, yang disebut dengan polimorfisme genetika.<sup>2,3</sup>

Di dalam forensik genetik sendiri, membedakan DNA antara kembar monozigot merupakan tantangan besar karena identik secara umum. Pemeriksaan *short tandem repeats* (*STR*) yang umumnya dilakukan menggunakan DNA inti tidak dapat melihat perbedaan mutasi khusus yang terjadi sangat kecil atau secara epigenetik pada kembar monozigot.<sup>4</sup> Menurut literatur, penggunaan DNA mitokondria dapat menjadi solusi terhadap hal ini dengan memanfaatkan sifat khusus dari DNA mitokondria, yaitu memiliki *high copy number* dan diturunkan dari garis keturunan ibu (matrilineal).<sup>1,3,4</sup> Analisis DNA mitokondria pada manusia dengan menggunakan daerah noncoding control region (CR) diketahui memiliki hasil yang cukup baik untuk mengetahui adanya mutasi lebih jauh sehingga dapat diaplikasikan pada kasus kembar monozigot.<sup>4</sup> Hal ini diharapkan dapat membantu dalam kasus penegakkan hukum, meskipun pemeriksaan ini tidak serta merta mudah untuk diterima oleh kalangan penegak hukum, dikarenakan sistem hukum di Indonesia belum mengatur secara khusus tentang teknologi yang dapat diterima sebagai bukti di pengadilan.<sup>1</sup>

## Struktur DNA

DNA diperkenalkan oleh James D. Watson dan Francis Crick pada tahun 1953. *Deoxyribonucleic acid* (DNA) merupakan rangkaian polimer tidak bercabang yang tersusun dari 4 jenis molekul asam nukleotida, yang terdiri dari gugus deoksiribosa, fosfat anorganik, dan salah satu dari basa purin; adenin (A) dan guanin (G), atau salah satu dari basa pirimidin; timin (T) dan sitosin (C). Keempat jenis basa tersebut terangkai dengan ikatan kovalen fosfodiester sehingga dapat tersusun sedemikian rupa dengan rangkaian fosfat-deoksiribosa

sebagai tulang punggung. Rangkaian terdiri atas dua rantai yang molekul-molekulnya saling komplementer, satu basa purin (A dan G) berpasangan dengan satu basa pirimidin (T dan C) yang diikat dengan ikatan hidrogen (gambar 2.1). Ikatan-ikatan kimia tersebut mempengaruhi struktur rangkaian, sehingga membentuk *double helix*.<sup>1,5,6</sup>



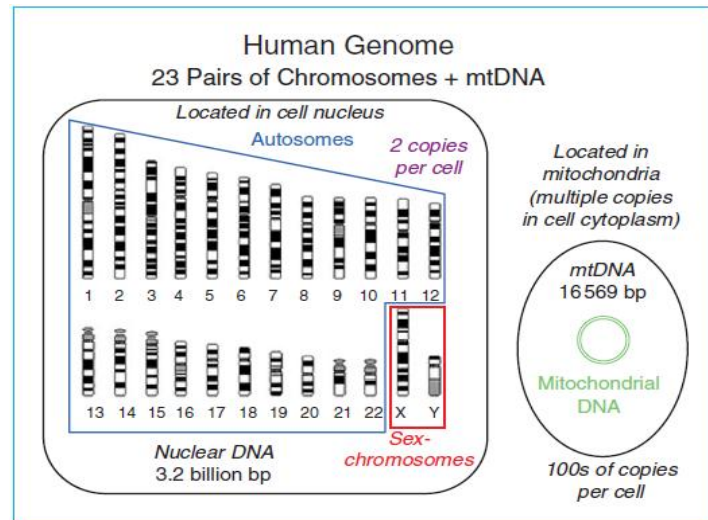
**Gambar 1. Lokasi DNA. (a) nDNA dan mtDNA; (b) ikatan basa DNA**

Keseluruhan rangkaian DNA ini disebut sebagai genom. Pada manusia, genom terdapat di dua lokasi, yaitu (1) di dalam inti sel yang disebut genom inti (nDNA) yang memiliki panjang sekitar 3,3 miliar *base-pair* atau pasang basa (pb); (2) di dalam organel mitokondria disebut genom mitokondria (mtDNA) dengan panjang sekitar 16.569 pb. Rangkaian molekul DNA tersusun secara ireguler, namun tidak acak. Rangkaian tersebut berisi informasi yang mensyaratkan urutan molekul tertentu agar menghasilkan materi yang dibutuhkan oleh individu untuk hidup.<sup>1-3,7</sup>

Terjadinya pewarisan sifat dari kedua orang tua, ayah dan ibu ke anak turunannya adalah akibat terjadinya peleburan kromosom dari sel sperma dan sel telur. Masing-masing sel kelamin memiliki 22 autosom dan satu gonosom yaitu X atau Y. Peleburan dua set sel kelamin sekaligus menyatukan kromosom pada sel sperma dan sel telur. Sel telur yang telah dibuahi, bakal calon anak atau zigot, mengandung dua set gen dalam kromosom dengan demikian untuk setiap pasangan kromosom yang bersesuaian, kita mewarisi satu kromosom dari ayah dan satu kromosom dari ibu. Ini menjelaskan mengapa ada sifat dan karakter tubuh suatu individu yang mirip ayah dan di sisi lain ada sifat dan karakter tubuh kita yang mirip ibu (gambar 2.2).<sup>8</sup>

Cara kromosom kita berpasangan, kita memiliki dua salinan dari setiap urutan dalam DNA kita. Setiap salinan dari urutan tertentu disebut alel. Dalam sebagian besar kasus, seorang individu hanya akan memiliki dua alel untuk setiap penanda, satu pada masing-masing dua

kromosom pada pasangan yang relevan. Namun, dalam kasus yang jarang terjadi, seorang individu dapat memiliki penghapusan atau duplikasi kromosom kecil yang menghasilkan masing-masing memiliki satu atau tiga alel untuk polimorfisme.<sup>1</sup>



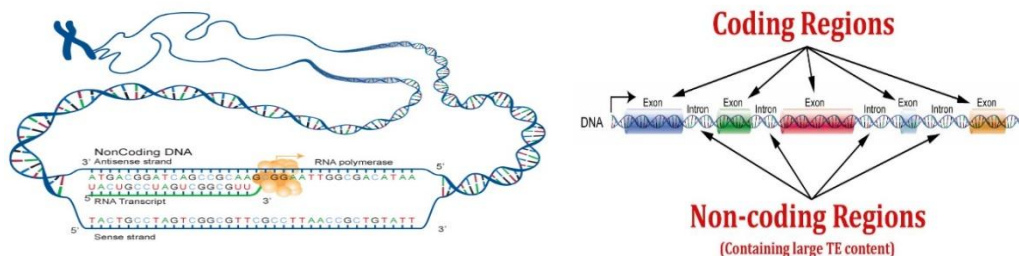
Gambar 2. Genom manusia yang terkandung dalam setiap sel inti dan mitokondria<sup>9</sup>

Beberapa lokus sangat bervariasi sehingga dapat menemukan urutan yang berbeda pada dua alel lokus tertentu dalam DNA satu individu. Rentetan urutan DNA yang dapat diamati dua atau lebih variasi urutan yang berbeda dalam suatu populasi dianggap polimorfik (poli = banyak dan morf = bentuk), dan disebut sebagai polimorfisme.<sup>3</sup> Dua alel yang dimiliki individu di lokus disebut sebagai genotipe individu untuk lokus itu. Seseorang yang memiliki kedua alel polimorfisme identik dikatakan memiliki genotipe homozigot untuk polimorfisme tersebut, sedangkan seseorang yang memiliki dua alel berbeda untuk polimorfisme dikatakan heterozigot untuk polimorfisme tersebut. Setiap individu hanya memiliki satu alel untuk setiap lokus. Pengumpulan alel pada kromosom Y disebut sebagai haplotipe kromosom Y. Istilah profil DNA dan profil genetik digunakan untuk menunjukkan kombinasi individu genotipe di semua polimorfisme yang diuji.<sup>1,3</sup>

Daerah pada rangkaian DNA yang mengkode informasi disebut *coding region* atau gen. Informasi tersebut akan diekspresikan melalui penerjemahan urutan DNA untuk menghasilkan polinukleotida lain berupa rangkaian *Ribonucleic Nucleotide Acid* (RNA) melalui proses transkripsi, yang kemudian diterjemahkan kembali (trasnlas) untuk menghasilkan polimer rangkaian polipeptida tertentu sehingga membentuk protein.<sup>1,3</sup>

Sebagian rangkaian lainnya tidak mengkode informasi disebut *non-coding region*. Pada *non-coding region* terdapat variasi urutan nukleotida yang berbeda antar individu (Gambar 3). Variasi dapat berupa adanya perbedaan satu nukleotida saja disebut SNPs (*Singel Nucleotide*

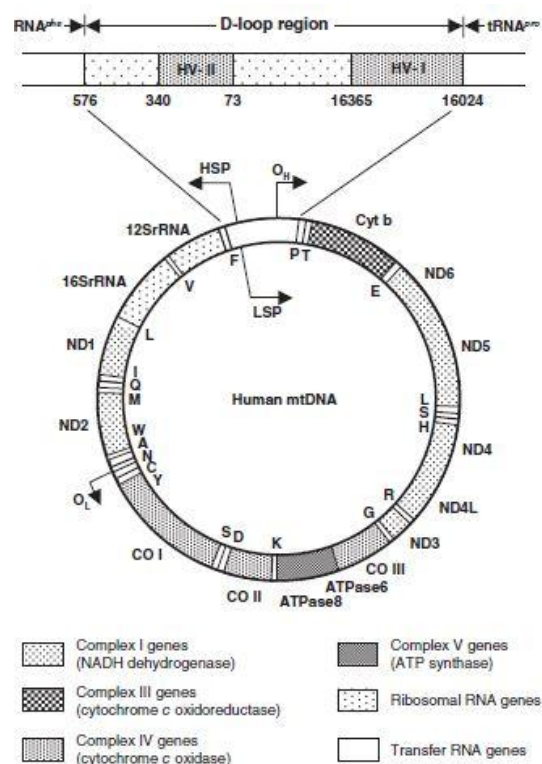
*Polymorphisms*). Variasi urutan panjang nukleotida antar individu disebut *tandem repeat*. Semakin variatif suatu *non-coding region* dalam populasi, semakin mudah kita menggunakannya untuk membedakan satu individu dari individu yang lain, dan semakin mudah untuk kepentingan identifikasi kasus-kasus yang terkait DNA.<sup>1,3</sup>



Gambar 3. Coding region dan non-coding region

## DNA Mitokondria

Genom mitokondria atau *mitochondrial DNA* (mtDNA) adalah genom yang berada dalam mitokondria, yaitu organel sitoplasma esensial yang menyediakan sebagian besar energi yang diperlukan untuk sel. Mitokondria berfungsi mengubah energi yang berasal dari bahan bakar kimia melalui proses fosforilasi oksidatif. Setiap mitokondria bisa mengandung 2-10 DNA mitokondria yang homolog, dan setiap sel manusia memiliki satu hingga ratusan genom mitokondria.<sup>3</sup>



Gambar 4. Peta Genetik DNA Mitokondria<sup>10</sup>

DNA mitokondria berbentuk melingkar dan memiliki panjang sekitar 16.569 pb. Molekul mtDNA merupakan molekul polimer rantai ganda, satu rantai *heavy* (H) *strand* dan rantai lainnya *light* (L) *strand*. H-*strand* kaya akan purin (adenin dan guanin), sedangkan L-*strand* didominasi pirimidin (timin dan sitosin). Ketika sel yang aktif secara metabolik diobservasi di bawah mikroskop elektron, sekumpulan besar mtDNA muncul untuk mengisi tiga struktur pendek yang mewakili tahap inisial replikasi (*non-coding area*) yang disebut *Displacement loop* (D-loop) pada nomor nukleotida (nt) 16.024-567, sering disebut sebagai *control region* (CR) karena segmen ini berisi elemen *origin* replikasi, inisiasi transkripsi, dan regulator. Pada D-loop terdapat segmen yang disebut *hypervariable segment* I-II dan memiliki tingkat polimorfisme tertinggi di dalam mtDNA.<sup>1,10,11</sup> Pada D-loop terdapat bagian yang disebut *C-stretch*, yang dikaitkan dengan variasi panjang urutan yang terletak di 16180~16193 nt. Adanya kesalahan DNA polimerase selama replikasi, *C-stretch* terbentuk mutasi lebih cepat daripada daerah mtDNA lainnya, hal mungkin terlibat dalam pengembangan penyakit genetik seperti kanker.<sup>12</sup>

Menurut sistem CRS (*Cambridge Reference Sequence*), posisi inisial I berada dekat pertengahan *control region*. Jumlah basa kemudian meningkat pada arah 5'→3' pada L-*strand*, dan karena sifat sirkularnya, posisi akhir 16.569 berada di sebelah 1. CRS direvisi dan dinamakan rCRS. Melalui revisi ini, CRS asli yang telah ditentukan dari individu tunggal ditemukan berisi beberapa polimorfisme yang jarang. Hal ini menekankan bahwa CRS (rCRS) tidak bisa dinilai sebagai sekuen autentik akan tetapi seharusnya digunakan sebagai sekuen referensi untuk memfasilitasi perbandingan di antara sekuen yang diambil di literatur dan yang ditentukan dari sampel. Perlu diketahui bahwa kesamaan struktur kasar dan pengaturan genetik di antara mamalia menyebabkan mtDNA hewan bias dinomori menggunakan CRS.<sup>13</sup>

Secara fungsional, mtDNA mamalia dan manusia dibagi menjadi *coding* dan *control region*. Daerah *coding region* berisi 37 gen tanpa intron yang mengkode 2 ribosomal RNA (12S dan 16SrRNA), 22 transfer RNA (tRNA) dan 13 protein enzim. 22 tRNA merupakan set minimum yang dibutuhkan untuk translasi dari mtDNA, dan keseluruhan dari 13 protein terlibat dalam proses fosforilasi oksidatif. Protein yang dikode mtDNA adalah protein yang berperan dalam fosforilase oksidatif, yaitu 7 subunit kompleks I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6) dan satu subunit kompleks III (sitokrom b), 3 subunit kompleks IV (COX I, II dan III) dan 2 subunit kompleks 5. Ada beberapa gen yang saling tumpang tindih, selain itu mtDNA memiliki kode genetik yang berbeda dengan kode genetik nDNA. Daerah *control region*, yang bertanggungjawab terhadap D-loop, diikat oleh gen untuk tRNA<sub>phe</sub> dan tRNA<sub>pro</sub>. Panjangnya sekitar 1122 bp (CRS) dan bisa bervariasi dengan satu atau lebih basa disebabkan oleh delesi,

insersi, atau repetisi. Daerah *control region* mengandung tempat mengikat untuk promotor utama dari transkripsi dan asal dari replikasi H-strand (OH). Daerah ini juga mengandung daerah polimorfik HVS-I dan HVS-II. HVS-I berkisar dari nt 16.024~16.365 dan HVS-II berkisar antara nt 73~340. Regio yang hipervariabel ini mewakili titik mutasi yang terjadi dari sisa penggabungan sebelumnya atau mutasi yang tetap.<sup>13</sup>

Ada beberapa karakteristik mitokondria yang berkontribusi terhadap tingginya variasi laju mutasi mtDNA yang 10-17 kali lebih cepat dibandingkan dengan nDNA, yaitu: (1) mtDNA tidak dilindungi oleh protein histon; (2) metabolisme energi dalam mitokondria (siklus Krebs) sangat aktif, satu molekul glukosa memproduksi 30 molekul *adenosine triphosphate* (ATP). Proses fosforilasi oksidatif terjadi pada membran mitokondria dan menghasilkan produk sampingan berupa radikal bebas, hal ini lah yang mengakibatkan mtDNA rentan mengalami mutasi yang lebih banyak muncul di *non-coding area*, karena mutasi yang terjadi dalam gen akan mudah tereliminasi dalam populasi.<sup>1,13</sup>

Berdasarkan hasil replikasi klonal dari mtDNA maternal, semua kopi genom mtDNA adalah identik (homoplasmi).<sup>1,10,13</sup> Oleh karena tingginya jumlah kopi mtDNA, terdapat mutasi pada beberapa campuran varian genom mtDNA. Kondisi ini dikenal sebagai heteroplasmi. Heteroplasmi merupakan adanya dua atau lebih subpopulasi (tipe) genom mtDNA dalam mitokondria, sel, jaringan, organ atau individu dan bisa dilihat dalam beberapa cara seperti satu atau lebih tipe mtDNA pada satu jaringan sampel, dan satu tipe mtDNA pada satu jaringan sampel serta perbedaan tipe mtDNA pada sampel lainnya.<sup>1,13</sup> Kenyataannya, anak dari ibu heteroplasmi bisa saja homoplasmi. Hal ini terjadi melalui pewarisan tipe mtDNA ibu dominan (atau satu dari tipe dominan) dikarenakan mekanisme *bottleneck* yang mengalami tipe segregasi minor mtDNA.<sup>13-15</sup>

Heteroplasmi paling sering dilihat pada sampel rambut karena terjadinya penyimpangan genetik dan *bottleneck* tercipta karena semiklonal folikel rambut alami. Salah satu kerugian menggunakan mtDNA untuk identifikasi forensik individual adalah kemungkinan kejadian heteroplasmi yang akan membingungkan interpretasi hasil dan secara potensial menyebabkan kesalahan eksklusi daripada kecocokan. Bagaimanapun adanya heteroplasmi dapat meningkatkan kekuatan kecocokan jika terdapat pada kedua sampel yang tidak diketahui.<sup>10,13,14</sup>

Heteroplasmi pada *C-stretch* dalam HVS-I dan HVS-II menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara populasi yang berbeda. Seseorang dapat memiliki panjang *C-stretch* yang berbeda pada jaringan yang berbeda. *C-stretch* tidak mudah terdeteksi bila dibandingkan dengan daerah lain dari mtDNA, ditunjang dengan panjang heteroplasmi yang berbeda meningkatkan kesulitan pengurutan DNA. *C-stretch* terletak di tengah HVS-I, dan apabila

terjadi kegagalan dalam mencari *C-stretch* dapat menghambat penerapan *CR* mtDNA untuk identifikasi forensik dan studi genetika populasi.<sup>12</sup>

DNA mitokondria diturunkan hanya melalui garis keturunan ibu, yang artinya semua anak dari ibu yang sama, baik wanita maupun pria, akan memiliki mtDNA yang identik dengan mtDNA ibu, paman, dan bibi yang seibu dengan pihak ibu juga identik dengan mtDNA nenek dari ibu dan seterusnya. Hal ini terjadi karena pada saat proses pembuahan, mtDNA ayah tidak masuk ke dalam ovum karena terletak di daerah ekor sperma.<sup>1,16</sup>

### **Identifikasi Forensik dengan DNA**

Identifikasi DNA adalah upaya untuk membandingkan antar profil DNA barang bukti dengan pembandingan, sehingga dapat disimpulkan apakah profil DNA barang bukti sama dengan pembandingan atau tidak. Pola pewarisan yang spesifik pada nDNA dan mtDNA menentukan teknis identifikasi DNA.<sup>1</sup> DNA dapat diambil dari berbagai bahan biologis, termasuk rambut dan cairan tubuh, atau bagian tubuh tertentu. DNA terdapat pada setiap sel, pada inti sel dan mitokondria. DNA juga bukan hanya terdapat pada manusia, namun tumbuhan dan hewan.<sup>17</sup> Penurunan DNA antara inti dan mitokondria mempunyai mekanisme yang berbeda.<sup>18</sup>

Kehadiran profil DNA yang cocok dengan tersangka dari bukti DNA tidak selalu berarti melibatkan tersangka dalam suatu kejahatan tertentu, tetapi menempatkan tersangka di tempat kejadian pada suatu waktu. Teknik pencetakan DNA modern membutuhkan jumlah materi sampel yang sangat kecil. Akibatnya, risiko kontaminasi bukti biologis sangat tinggi. Sebagai contoh, satu sel cukup untuk pemeriksaan DNA. Namun, sekali bersin atau batuk bahkan sentuhan ringan dapat menyimpan lebih dari cukup DNA untuk mencemari barang bukti, sehingga harus mengambil tindakan pencegahan untuk meminimalkan resiko kontaminasi.<sup>17</sup>

Untuk pemeriksaan barang bukti, DNA inti (nDNA) dinilai sebagai parameter identifikasi yang utama di antar metode identifikasi lain karena tingkat spesifisitas dan sensitifitas yang sangat tinggi, sehingga baik untuk identifikasi dalam perkara kriminal tanpa perlu didukung oleh bukti-bukti lain. Metode identifikasi ini disebut identifikasi primer selain sidik jari dan identifikasi gigi.<sup>1,19,20</sup>

DNA dapat tertinggal dan tersimpan secara langsung pada suatu tempat dimana pun, sehingga harus diperhatikan oleh petugas penyidik:<sup>2</sup>

1. DNA tersangka tersimpan di tubuh atau pakaian korban,
2. DNA tersangka tersimpan pada suatu benda,
3. DNA tersangka tersimpan di suatu lokasi,

4. DNA korban tersimpan di tubuh atau pakaian tersangka,
5. DNA korban tersimpan pada suatu objek,
6. DNA korban tersimpan di suatu lokasi,
7. DNA saksi tersimpan pada korban atau tersangka,
8. DNA saksi tersimpan pada suatu objek atau di suatu lokasi

## **Pemeriksaan DNA**

*DNA profiling* adalah suatu metode pengujian material barang bukti forensik yang melibatkan teknik biologi molekular untuk mendapatkan profil DNA dari sejumlah sampel uji yang merupakan bahan biologis. Profil DNA dari berbagai sumber dapat dicocokkan untuk menunjukkan keterkaitan biologis berbagai materi uji, sehingga dapat mendukung suatu pembuktian forensik. Dalam *profiling DNA* ada beberapa proses berdasarkan ketentuan INTERPOL (*International Criminal Police Organization*), yaitu:<sup>21</sup>

### **1. Tahap 1: Identifikasi**

Barang bukti yang ditemukan di tempat kejadian akan dikirim ke laboratorium forensik untuk pemeriksaan lebih lanjut. Untuk pemeriksaan dapat menggunakan bahan kimia atau alat tertentu. Barang bukti dapat berupa Cairan tubuh, jaringan tubuh. Jaringan tubuh dapat berupa sel epitel kulit. Cairan tubuh dapat berupa darah ataupun semen.

### **2. Tahap 2: Ekstraksi DNA**

Ekstraksi adalah proses melepaskan DNA dari sel. DNA harus di peroleh dari sel atau jaringan tubuh. DNA diekstraksi dari sel dengan membuang semua protein, membran dan bahan seluler lainnya yang ada dalam sampel biologis.<sup>19,21,22</sup> Ada beberapa metode ekstraksi DNA yang biasa digunakan:<sup>23</sup>

- a. Metode *Phenol Chloroform Isoamly Alcohol* (PCIA)
- b. Metode *Ion Exchange Resin Chelex*
- c. Metode *Double Spin Column*

### **3. Tahap 3: Amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

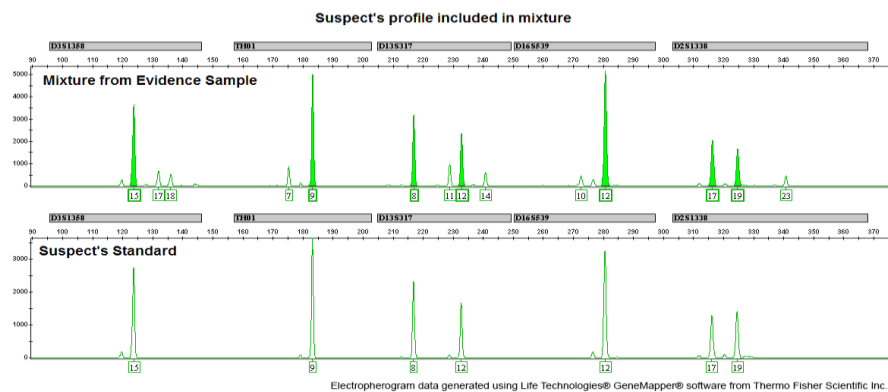
Tahap ini meningkatkan atau memperkuat, jumlah sangat kecil dari DNA yang ada dalam sampel forensik ke jumlah yang akan memungkinkan profil DNA terdeteksi. PCR melakukan ini hingga terbentuk profil DNA yang disebut *Short Tandem Repeats* (STR) menjadi penanda pilihan karena mereka menampilkan varian alel yang besar pada populasi tertentu.<sup>21</sup>

### **4. Tahap 4: Pemisahan dan Pewarnaan**



Apabila sampel DNA telah cukup digandakan, maka dilanjutkan dengan proses elektroforesis. Elektroforesis adalah metode yang dirancang untuk memisahkan fragmen DNA yang berbeda ukurannya. Melalui elektroforesis mereka disortir berdasarkan ukuran dan ditampilkan dalam elektroforogram (EPG). Ini memungkinkan ukuran fragmen untuk diukur dari informasi profil DNA berbasis STR dapat diperoleh.<sup>21</sup>

## 5. Tahap 5: Analisis dan Interpretasi



**Gambar 5. Membandingkan DNA barang bukti dengan curiga tersangka**

Untuk analisis identifikasi individu, seluruh alel individu dicocokkan dengan pembanding. Selain pembacaan dan pembandingannya harus teliti, pendekatan rumus statistik yang digunakan juga berbeda. Setelah dianalisis dan interpretasi maka membuat kesimpulan. Ada tiga macam kesimpulan dalam identifikasi forensik yaitu: eksklusi, inklusi, dan tidak dapat disimpulkan.<sup>1</sup>

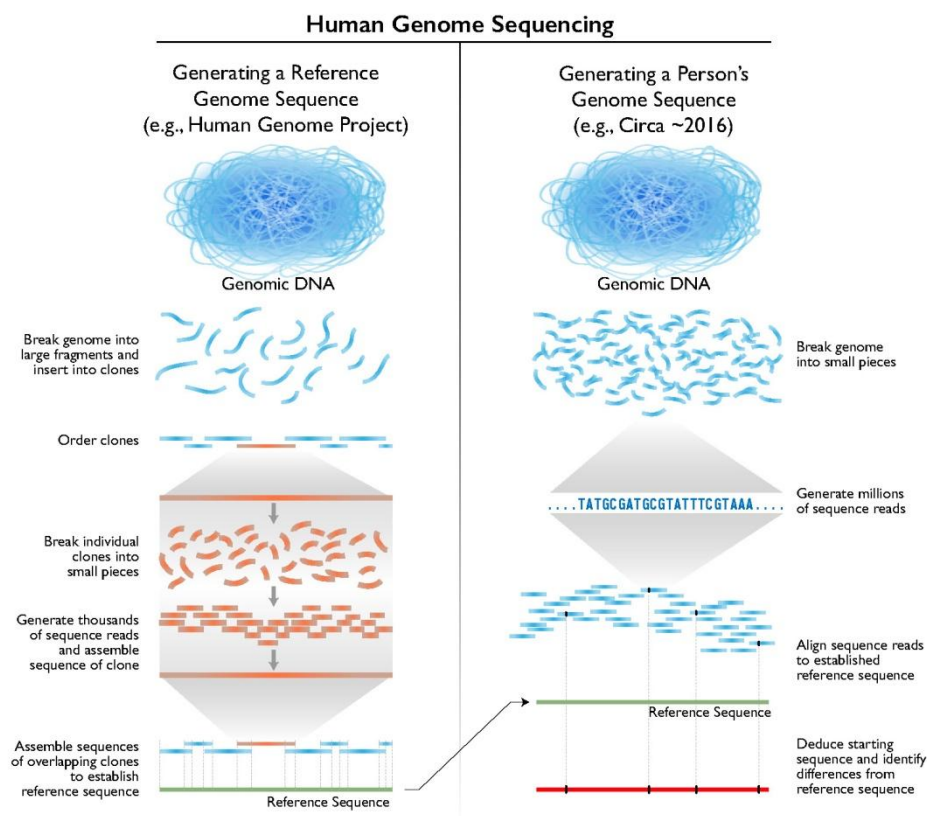
## Sekuensing DNA

Sekuensing DNA atau pengurutan basa DNA merupakan teknik kunci dalam perkembangan ilmu pengetahuan, di antaranya genetika, bioteknologi, biologi molekuler, dan genomika. Sekuensing DNA bertujuan untuk menentukan urutan basa nitrogen (adenin, guanin, sitosin, dan timin) suatu sampel DNA. Salah satu contoh aplikasi ambisius teknologi sekuensing DNA yaitu pengurutan genom manusia melalui proyek yang dikenal *Human Genome Project*. Dalam ilmu kedokteran, sekuensing DNA digunakan untuk mengidentifikasi, mendiagnosis, dan mengembangkan pengobatan penyakit genetik.<sup>24</sup>

Pada awalnya, alat untuk membaca urutan basa DNA hanya mampu menentukan urutan basa DNA yang panjangnya kurang dari 1.000 basa. Oleh karena itu, untuk sekuensing genom, molekul DNA harus dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil agar dapat dibaca oleh alat tersebut. Data urutan DNA yang dihasilkan kemudian disusun ulang menggunakan program komputer sehingga urutan keseluruhan DNA dapat diketahui. Sebelum ditemukannya alat yang

mampu membaca urutan DNA secara paralel dalam jumlah besar, peruntukan basa-basa DNA (*sequencing*) memakan waktu, tenaga, dan biaya yang sangat besar.

Metode sekuensing DNA yang pertama kali digunakan adalah metode Sanger (*Sanger dideoxy sequencing*). Metode ini menggunakan DNA templat dan memerlukan primer spesifik untuk reaksi sekuensing. Teknologi sekuensing Sanger dan modifikasinya mendominasi metode sekuensing selama 30 tahun. Panjang sekuen yang dihasilkan berkisar antara 1.000–1.200 pasang basa pb dan tidak mampu mencapai lebih dari 2.000 pb.



Gambar 6. Perbedaan proses *whole-genome sequencing* dan *next-generation sequencing*<sup>25</sup>

Generasi kedua teknologi sekuensing setelah generasi pertama Sanger dikenal dengan *next-generation sequencing* (NGS). Teknologi NGS membaca templat DNA secara acak (random) sepanjang seluruh genom dengan membuat potongan-potongan pendek DNA genom, kemudian menyambungkannya dengan adapter (potongan DNA pendek yang didesain khusus untuk tujuan ini) agar dapat dibaca oleh mesin NGS secara random selama proses sintesis DNA. Dengan demikian, teknologi NGS sering disebut dengan sekuensing paralel secara masif (*massively parallel sequencing*). Panjang bacaan sekuen DNA yang dihasilkan mesin NGS jauh lebih pendek dibandingkan bila menggunakan mesin sekuensing dengan metode Sanger.

NGS menghasilkan panjang sekuen DNA antara 50–500 pb. Karena sekuen yang dihasilkan NGS pendek, sekuensing setiap fragmen DNA mesti dilakukan lebih dari sekali ukuran genom (*genome sequence coverage*). Sebagai contoh, bila *sequence coverage* suatu genom 30 kali berarti fragmen-fragmen DNA pada genom tersebut disekuen 30 kali sehingga setiap fragmen DNA dalam genom dibaca mesin 30 kali. Hal ini dilakukan untuk menjaga akurasi data hasil sekuensing.

Penerapan inovasi teknologi NGS berkembang sangat cepat dan berbagai kemajuan telah dicapai. Tiga teknologi NGS utama yang tersedia saat ini adalah *Roche/ 454 pyrosequencing platform*, *Illumina Solexa polymerase sequencing platform*, dan *ABI/SOLID ligase sequencing technology*. Dibandingkan dengan metode sekuensing Sanger, ketiga teknologi NGS ini menghasilkan data sekuen yang jauh lebih banyak dalam sekali menjalankan alat. Teknologi NGS merupakan revolusi metode sekuensing dan menghasilkan data sekuen yang luar biasa besar dalam waktu relatif singkat dibandingkan dengan metode sekuensing Sanger.<sup>24</sup>

### Prinsip dan Interpretasi Pemeriksaan DNA Mitokondria

Prinsip pemeriksaan mtDNA secara umum mirip dengan pemeriksaan DNA inti dengan perbedaan proses *genotyping*,<sup>13</sup> terdiri atas beberapa tahap utama, yaitu:



**Gambar 7. Tahapan Pemeriksaan mtDNA<sup>1</sup>**

Bagian mtDNA yang diperiksa adalah daerah *D-loop*, yaitu pada segmen HVS I, lalu dipertajam dengan segmen HVS II. Setelah dilakukan perbanyakan kedua segmen, dilakukan sekuensing agar urutan DNA segmen dapat dibaca. Dilakukan sekuensing dua arah yaitu hasil PCR yang disekuensing pada *H-chain* dan *L-chain*.<sup>1,13</sup>

Setelah urutan mtDNA sampel diperoleh dilakukan perbandingan dengan segmen HVS I dan HVS II pembanding yaitu urutan standar rCRS yang diakses dari *genebank*. Jika dua sampel yang diperiksa menunjukkan *haplotype* yang berbeda, maka tidak masalah untuk mengatakan bahwa kedua sampel tersebut berasal dari individu yang berbeda (eksklusi). Ditetapkan standar minimum dua perbedaan urutan mtDNA HVS I dan HVS II. Jika urutan mtDNA HVS I dan HVS II dari dua sampel identik atau *match*, maka orang tersebut tidak dapat disingkirkan dari kemungkinan individu yang dicari (inklusi). Kesimpulan ini harus ditunjang dengan *probability of identity* untuk dapat lebih meyakinkan.<sup>1,3,13</sup>

Molekul mtDNA diturunkan melalui garis keturunan ibu, maka orang yang memiliki mtDNA yang sama jumlahnya banyak. Angka ini dapat dihitung secara statistik berdasarkan distribusi frekuensi *haplotype* mtDNA dalam suatu populasi. Sebagian besar laboratorium forensik memperoleh angka estimasi frekuensi dari hasil *pseudocounting method*, yaitu menghitung frekuensi (jumlah orang) yang memiliki urutan mtDNA yang identik dengan sampel tersebut didalam populasi. Selanjutnya dihitung *likelihood ratio* dengan cara membagi angka *probability of match* dengan angka *random match probability*.<sup>1,26</sup>

Analisis segmen HVS I dan HVS II mtDNA memiliki keterbatasan. Direkomendasikan identifikasi mtDNA dengan melibatkan seluruh daerah mtDNA dan perlu dikembangkan pendekatan diskriminatif baru yang memberikan hasil bermakna. Analisis mtDNA secara menyeluruh sangat menjanjikan, tetapi dianggap masih terlalu mahal.

### **Telaah Kasus: Identifikasi Penjahat dengan Menggunakan Analisis DNA**

Yuan *et al.* telah memberikan satu laporan kasus mengenai identifikasi penjahat yang kembar monozigot dengan menggunakan analisis DNA mitokondria (mtDNA) dengan mesin *Next-Generation Sequencing*. Yuan *et al.* membahas bahwa proses *Short Tandem Repeats* (STR) yang biasanya dilakukan pada DNA inti (nDNA) tidak dapat menggambarkan adanya perbedaan genetik signifikan pada kembar monozigot, sehingga pada jurnal ini dilakukan *next-generation sequencing* (NGS) untuk melihat adanya perbedaan genetik yang sangat kecil. Proses ini memanfaatkan sifat mtDNA yang memiliki sifat *high copy number* dan diturunkan berdasarkan garis keturunan ibu (matrilineal). Sampel yang diambil berasal dari darah, *buccal mucosa*, cairan semen, kuku, dan rambut kedua individu kembar identik. Pada sampel tersebut dilakukan *STR typing* dengan menggunakan *RelaxGene Blood* untuk darah, metode *Chelex-100* untuk ekstraksi dari *buccal mucosa*, cairan semen, kuku, dan folikel rambut. Lalu proses dilanjutkan dengan proses *whole-genome sequencing* sehingga mendapatkan pemetaan data genetik yang cukup unik dan berkualitas baik sebagai data perbandingan dengan hasil dari *next-generation sequencing*. Setelah itu dilakukan amplifikasi dengan ARMS-PCR pada *single nucleotid polymorphisms* (SNPs) yang teridentifikasi adanya mutasi gen untuk mengonfirmasi bahwa mutasi m.603T > C hanya terdapat pada sampel milik SA2. Selanjutnya, dilakukan *next-generation deep sequencing* pada hasil amplifikasi (amplikons), agar mutasi lainnya dapat teridentifikasi lebih lanjut. Pada hasil akhir, dengan *whole-genome sequence* didapatkan adanya mutasi alel m.6903 T > C yang terdeteksi pada sampel di kasus 1 serta 2 dan mutasi alel ini hanya dimiliki oleh salah satu dari individu pada kembar identik terduga pelaku kejahatan ini, yaitu SA2. Hasil dari *next-generation sequencing* memperlihatkan adanya mutasi

minor pada m.6935C > T (17,91%) dan m.6938C>T (18,79%) pada sampel sperma SA1, tidak sesuai dengan mutasi yang ada pada kasus sehingga dapat ditentukan bahwa pelakunya adalah SA2.<sup>4</sup>

Saat ini, pengujian paternitas dan identifikasi genetik dalam kerja kasus forensik dilakukan dengan menguji serangkaian 16-24 *short tandem repeats*. Tantangan terjadi pada kembar identik memiliki profil mikrosatelit yang identik, sehingga mereka tidak dapat dibedakan dengan menggunakan *STR*. Ketidakmampuan ini menyebabkan masalah dalam kasus pidana dan probabilitas untuk kembar identik adalah 3:1.000 kelahiran, sekitar 6 dari 1000 laki-laki adalah kembar identik. Krawczak et al. menyatakan bahwa > 80% keturunan dari satu saudara kembar akan membawa setidaknya satu mutasi *germline* yang dapat dideteksi dalam sperma ayah mereka, tetapi tidak di antara saudara kembar ayahnya.<sup>27</sup> Hal ini menjadi tantangan sendiri pada dunia forensik genetika.

Meski identifikasi nDNA dalam bentuk *STR* pada aspek spesifisitas mengungguli mtDNA karena adanya tahap rekombinasi proses pewarisan nDNA sehingga variasi nDNA antar manusia menjadi sangat tinggi, mtDNA memiliki keunggulan pada hal sensitivitas berupa lebih mudah ditemukan pada spesimen yang telah mengalami degradasi lebih besar.<sup>1</sup> Selain itu juga terdapat penelitian yang menunjukkan bahwa beberapa segmen gen mtDNA dapat meningkatkan tingkat diskriminasi terutama dalam membedakan individu dengan *hypervariable segment I* (HVS I) dan HVS II identik, hal ini berkaitan dengan salah satu karakteristik dari mtDNA, yaitu *high copy number*.<sup>1</sup> Polimorfisme tertinggi di daerah mtDNA berada di daerah *D-loops*, terutama pada daerah *C-stretch* karena adanya kesalahan DNA polimerase.<sup>12</sup>

Yuan *et al.* juga membahas tentang penggunaan *next-generation sequencing* pada mtDNA yang dikombinasikan dengan penggunaan *whole genome sequencing* yang memiliki waktu lama, bahkan hingga berbulan-bulan dan peta genetik yang dihasilkan berkapasitas cukup besar (pada kasus ini data yang dihasilkan sebesar 1,8 GB yang berisi identifikasi dari 1800 lokus).<sup>4</sup> Proses yang lama ini akan mempengaruhi penggunaan dana penelitian, WGS dikalkulasikan menghabiskan dana ~\$14 juta dan kenyataannya bisa menghabiskan dana ~\$20-25 juta. Sementara *next-generation sequencing* dapat menekan biaya hingga ~\$40.000 sehingga kombinasi penggunaan kedua metode ini dapat membuat proses pengerjaan yang lebih singkat dengan hasil yang baik dan akurat.<sup>25</sup>

Jurnal yang ditulis oleh Yuan *et al.* juga membahas mengenai keterbatasan dari penggunaan mtDNA dalam proses identifikasi. Menurut Merheb (2019), penggunaan DNA mitokondria untuk identifikasi memiliki keterbatasan karena mtDNA diturunkan secara

maternal dan biasanya tidak mengalami rekombinasi. Dengan tidak adanya acara rekombinasi, keturunannya sangat mungkin untuk mewarisi DNA yang sama dari ibu, sehingga baik ibu, saudara kandung, atau individu terkait maternal lainnya akan memiliki profil mtDNA yang sama, ada kemungkinan untuk kesulitan dalam mengidentifikasi secara spesifik.<sup>4,16</sup> Namun, analisis penurunan sifat mtDNA pada hewan telah memberikan bukti bahwa genotipe mtDNA heteroplasmia dapat dengan cepat terpisah dalam keturunannya. Fenomena ini telah didokumentasikan dengan baik pada sapi Holstein, keturunan dari ibu memiliki rasio haplotipe mtDNA yang berbeda secara signifikan dari satu sama lain atau dari induk. Lebih lanjut, heterogenitas SNP yang terdiskriminasi menunjukkan bahwa mutasi yang tidak ada pada ibu dapat terjadi pada titik yang berbeda selama perkembangan embrio, yang juga pada kasus ini dapat berkontribusi pada keberadaan heterogenitas SNP yang berbeda dari salah satu individu kembar identik yang terduga pelaku kejahatan.<sup>4</sup>

Dari uraian sebelumnya, penggunaan *next-generation sequencing*, terutama pada pencarian profil DNA pada kembar identik dengan menggunakan mtDNA (yang ternyata lebih baik digunakan untuk pencarian mutasi kecil bila dibandingkan dengan nDNA) dapat menjadi salah satu alternatif apabila ada kasus serupa di masa depan dibandingkan dengan penggunaan *whole-genome sequencing* pada seluruh sampel yang memakan waktu lama dan biaya yang lebih besar dengan hasil yang serupa. Hal ini dengan catatan bahwa analisis mtDNA pun bergantung pada sampel yang diperoleh dalam kasus tersebut. Pengambilan sampel *buccal mucosa*, rambut, noda kontak, dan noda semen dalam kasus nyata secara legal dan etis lebih mudah daripada pengambilan sampel sperma, karena sampel sperma harus dilakukan atas izin individu tersebut.<sup>2,4</sup>

## Referensi

1. Syukriani YF. DNA Forensik. 1st ed. Bandung: Sagung Seto; 2012.
2. Butler JM. Forensic DNA typing. 2nd ed. Molecular Pathology in Clinical Practice. Burlington; 2007.
3. Syukriani YF. Polimorfisme Genetik. 1st ed. Bandung: Unpad Press; 2019.
4. Yuan L, Chen X, Liu Z, Liu Q, Song A, Bao G, et al. Identification of the perpetrator among identical twins using next-generation sequencing technology: A case report. Forensic Sci Int Genet [Internet]. 2020;44(September 2019):102167. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102167>
5. Gupta PK. Molecular Biology and Genetic Engineering. 4th ed. New Delhi: Rastogi Publication; 2019.

6. Michaelis R, Flanders R, Wulff P. A Litigator's Guide to DNA: From the Laboratory to the Courtroom. 1st ed. Burlington: Academic Press; 2008.
7. National Research Council. DNA Technology in Forensic Science [Internet]. Washington, DC: The National Academies Press; 1992. Available from: <https://www.nap.edu/catalog/1866/dna-technology-in-forensic-science>
8. Ratna Pertiwi K. Penerapan Teknologi DNA dalam Identifikasi Forensik. J Ilm WUNY. 2015;16(4).
9. Zubi ZS, Emsaed MA. Identifying Cancer Patients using DNA Micro-Array Data in Data Mining Environment. J Sci Eng. 2014;3(September).
10. Rapley R, Whitehouse D. Molecular Forensics. 1st ed. Vol. 45, Choice Reviews Online. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; 2007.
11. Ratnayani K, Wirajana I, Laksmiwati A. Analisis Variasi Nukleotida Daerah D-Loop Dna Mitokondria Pada Satu Individu Suku Bali Normal. J Kim. 2007;1(1).
12. Chen F, Dang YH, Yan CX, Liu YL, Deng YJ, Fulton DJR, et al. Sequence-length variation of mtDNA HVS-I C-stretch in Chinese ethnic groups. J Zhejiang Univ Sci B. 2009;10(10):711–20.
13. Hidayat T. DNA Mitokondria (mtDNA) Sebagai Salah Satu Pemeriksaan Alternatif Untuk Identifikasi Bayi pada Kasus Infantisida. J Kesehat Andalas. 2017;6(1):213.
14. Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R. Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2003;4(1).
15. Holland MM, Parsons TJ. Mitochondrial DNA Sequence Analysis - Validation and Use for Forensic Casework. Forensic Sci Rev. 1999 Jun;11(1).
16. Merheb M, Matar R, Hodeify R, Siddiqui SS, Vazhappilly CG, Marton J, et al. Mitochondrial DNA, a Powerful Tool to Decipher Ancient Human Civilization from Domestication to Music, and to Uncover Historical Murder Cases. Cells. 2019;8(5):433.
17. Elkins KM. Forensic DNA Biology: A Laboratory Manual. USA: Elsevier; 2013.
18. Wang C, Wein LM. Analyzing Approaches to the Backlog of Untested Sexual Assault Kits in the U.S.A. J Forensic Sci. 2018;
19. Noble RK. Interpol Handbook on Dna Data Exchange and Practice. 2nd ed. Interpol; 2009.
20. National Research Council Committee on DNA. The Evaluation of Forensic DNA Evidence. The Evaluation of Forensic DNA Evidence. Washington: National Academy

- of Science; 1996.
21. Interpol. Handbook on DNA data and practice - Recommendations from the INTERPOL DNA monitoring expert group. Manual. 2009;118.
  22. Budiyanto A, Widiatmaka W, Sudiono S. Ilmu Kedokteran Forensik. 2nd ed. Jakarta: Bagian Kedokteran Forensik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 1997.
  23. Marwayana ON. Ekstraksi Asam Deoksiribonukleat ( DNA ) dari Sampel Jaringan Otot. 2015;XL(December):1–9.
  24. Tasma IM. Pemanfaatan Teknologi Sekuensing Genom Untuk Mempercepat Program Pemuliaan Tanaman. J Penelit dan Pengemb Pertan. 2016;34(4).
  25. Wetterstrand KA. The Cost of Sequencing a Human Genome [Internet]. National Human Genome Research Institution. 2019 [cited 2020 May 26]. Available from: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>
  26. Buckleton J, Triggs CM, Walsh SJ. Forensic DNA Evidence [Internet]. 1st ed. New York. Boca Raton: CRC Press; 2005. Available from: <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=NLAOyCxpKJgC&oi=fnd&pg=PA2&dq=FORENSIC+DNA+EVIDENCE+INTERPRETATION&ots=jDLKRgpzQo&sig=IVRHLEJmDUsyBcbyq8zxDPMXhXI>
  27. Weber-Lehmann J, Schilling E, Gradl G, Richter DC, Wiehler J, Rolf B. Finding the needle in the haystack: Differentiating “identical” twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. Forensic Sci Int Genet [Internet]. 2014;9(1):42–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.10.015>