

PERBEDAAN KUANTITAS DNA YANG DIEKSTRAKSI DARI BUCCAL SWAB DENGAN JUMLAH USAPAN YANG BERBEDA

Devina Dea Emanuela¹, Tuntas Dhanardhono², Saebani²

¹Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

²Staf Pengajar Ilmu Forensik, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
JL. Prof. H. Soedarto, SH., Tembalang-Semarang 50275, Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar Belakang Sampel yang digunakan pada analisis DNA untuk individu hidup adalah darah dan *buccal swab*, namun pengambilan darah membutuhkan metode yang invasif yang dapat menyebabkan rasa tidak nyaman pada dapat menjadi pilihan yang baik dan nyaman dalam pengambilan sampel untuk pemeriksaan DNA, namun belum ada standar *Buccal swab* yang mengatur tentang jumlah usapan yang diperlukan dalam pengambilan buccal swab yang optimal.

Tujuan Mengetahui perbedaan kuantitas DNA yang diekstraksi dari buccal swab dengan jumlah usapan yang berbeda

Metode Penelitian menggunakan 44 sampel buccal swab diambil dari 11 individu laki-laki sehat dan diambil secara serial sebanyak 4x dengan selang waktu selama 1 minggu. Pada pengusapan pertama diambil sampel dengan 5x usapan, selanjutnya diambil sampel dengan 10x usapan, lalu diambil sampel dengan 20x usapan dan kemudian diambil sampel dengan 30x usapan. Setelah setiap pengambilan sampel dilanjutkan dengan ekstraksi DNA dengan metode chelex pada hari yang sama dengan pengambilan sampel kemudian dilakukan pengukuran kuantitas DNA menggunakan Nanodrop Spectrofotometer yang dibaca pada gelombang 260.

Hasil Didapatkan perbedaan yang bermakna pada setiap kelompok usapan ($p < 0.05$) dengan kelompok usapan 5x, 10x, dan 20x mengalami peningkatan kuantitas yang searah dengan penambahan pengusapan sedangkan kelompok 20x dan 30x usapan mengalami penurunan kuantitas yang berbanding terbalik dengan penambahan pengusapan hal ini dapat disebabkan karena bertambahnya saliva dan kontaminan dalam sampel yang mempengaruhi kuantitas DNA.

Kesimpulan Terdapat perbedaan kuantitas DNA dari buccal swab dengan jumlah usapan yang berbeda dengan kuantitas tertinggi didapatkan dari kelompok 20x usapan.

Kata Kunci buccal swab, kuantitas DNA, Nanodrop

ABSTRACT

Difference of DNA Quantity Extracted from Buccal Swab with Different Amount of Swab

Background Samples which usually used in DNA analysis from living subject are blood and buccal swabs. However, to acquire blood specimens, it needs an invasive method that can cause discomfort for the subject and also more expensive, therefore buccal swab can be a very good option to take samples for DNA analysis. Ironically, there has not been any standards that specified about the amount of swabs required to obtain the optimal DNA in buccal swab

Aim To know the difference of DNA quantity extracted from buccal swab with different amount of swabs

Method This experiment uses 44 buccal swabs samples acquired from 11 healthy male subjects. The samples are obtained in 4 sessions periodically with one week apart from each

session. For the first session the buccal swabs are obtain with 5 times swabbing, continued with 10 times swabbing, followed with with 20 times and finally with 30 times swabbing. After each swabbing the buccal swabs are taken to the laboratory for the DNA extraction using the chelex method and then quantified using the nanodrop spectrophotometer 2000 in the 260 wave length.

Result From the statistical analysis on each group of swabs it is found that every group has a meaningful statistical difference ($p < 0.05$) with the 5x, 10x and 20x swabs groups has an increase of DNA quantity along with the increase of swabbing however with the 20x and 30x swabs groups show a decrease in DNA quantity with the increase of swabbing, this phenomenon can be caused by the increase of saliva and contaminant in the 30x swabs group which effect the DNA quantity.

Conclusion There is a difference in the quantity of DNA extracted from buccal swabs with different amount of swabs with the optimum quantity of DNA obtained from the 20x swabs group.

Key Word Buccal swab, DNA quantity, Nanodrop

PENDAHULUAN

Pihak kepolisian sering dihadapkan pada kesulitan dalam memeriksa materi biologis yang ditemukan di tempat kejadian perkara (TKP) karena jumlahnya sangat sedikit atau telah mengalami degradasi.¹ Berbagai kasus sengketa paternitas sulit diatasi karena parameter yang digunakan, misalnya golongan darah, kurang tajam dalam membedakan karakteristik tiap individu.¹

Pemeriksaan DNA yang dikenal sebagai *DNA profiling* atau *DNA fingerprinting* yaitu pemeriksaan pada sampel jaringan atau cairan tubuh untuk mengidentifikasi individu, telah terbukti sebagai metode yang baik dan sangat tajam dalam membedakan individu karena dapat mengidentifikasi karakter dari satu atau lebih fitur unik pada genom individu.¹ Selama dua setengah dekade terakhir penggunaan DNA telah berkembang pesat dalam penyidikan. Kini sekitar 200 laboratorium forensik mampu mengerjakan ratusan ribu tes DNA per tahun di Amerika Utara. Selain itu, mayoritas negara Eropa, Amerika Selatan, Asia, serta Australia, Selandia Baru, dan beberapa negara di Afrika, telah memiliki program DNA forensik. Jumlah laboratorium di seluruh dunia yang dapat melakukan tes DNA akan terus bertambah seiring pengakuan komunitas hukum terhadap teknik pemeriksaan DNA.²

Pada dasarnya semua sel yang terdapat pada tubuh yang mempunyai inti sel dapat digunakan sebagai spesimen pemeriksaan *nuclear* DNA (nDNA) dan sel yang tidak mengandung inti sel dapat digunakan untuk pemeriksaan *mitochondrial* DNA (mtDNA), namun DNA yang paling akurat untuk tes adalah DNA inti sel karena DNA inti sel tidak bisa

berubah sedangkan DNA dalam mitokondria dapat berubah karena berasal dari garis keturunan ibu, yang dapat berubah seiring dengan perkawinan keturunannya.³

Secara umum pilihan utama yang digunakan untuk pemeriksaan DNA adalah darah. Spesimen darah dapat diperoleh dari darah vena, arteri atau kapiler namun prosedur ini membutuhkan tindakan yang invasif yang dapat menyebabkan rasa tidak nyaman bagi individu yang diperiksa, harga yang relatif mahal dan tidak praktis jika digunakan untuk pengambilan sampel dalam jumlah yang banyak.⁴

Pemeriksaan *buccal swab* dapat menjadi pilihan yang baik dan nyaman untuk individu yang diperiksa terutama pada balita atau anak-anak.⁵ Disamping itu sampel dari *buccal swab* lebih ekonomis, praktis dan lebih mudah untuk dilakukan pengiriman karena terhindar dari resiko pecahnya tabung yang dapat terjadi pada pengiriman dengan spesimen darah,⁶ namun belum ada standar yang mengatur secara spesifik mengenai jumlah usapan yang dibutuhkan untuk mengambil sampel *buccal swab* yang baik untuk pemeriksaan DNA, berbagai penelitian hanya menggunakan ukuran waktu seperti pada penelitian oleh Claire Mulot dan kawan-kawan yang melakukan prosedur dengan menggoreskan swab pada permukaan mukosa dinding mulut selama 15 detik⁷, dan pada penelitian oleh Amy H. Walker, dan kawan-kawan menggunakan acuan waktu usapan selama 15-30 detik.⁸ Sedangkan pada *Handbook of Forensic Services FBI laboratory division 2013* pada prosedur *buccal swab* hanya dicantumkan untuk melakukan usapan secara baik dan menyeluruh tanpa mencantumkan jumlah usapan yang dibutuhkan.

Oleh karena belum adanya panduan yang pasti serta penelitian yang dilakukan untuk mengetahui hal tersebut, peneliti tertarik untuk meneliti tentang pengaruh jumlah usapan yang dilakukan terhadap kuantitas DNA.

METODE

Penelitian observasional analitik studi *cross sectional* menggunakan data primer kuantitas DNA yang diekstraksi dari sampel *buccal swab*. Kriteria inklusi penelitian ini adalah *buccal swab* dengan Jumlah usapan 5x 10x 20x 30x yang dilakukan pada Mahasiswa laki-laki Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro angkatan 2013 yang tidak merokok tidak minum alkohol, tidak mempunyai riwayat diabetes, anemia dan radioterapi di sekitar mulut.

Kriteria Eksklusi penelitian ini adalah menolak untuk mengikuti seluruh proses pengusapan dari 5x 10x 20x dan 30x, mengalami penyakit pada mukosa mulut yang dapat mempengaruhi kuantitas DNA di tengah rangkaian penelitian atau mengalami perlukaan pada mukosa bukal akibat pengusapan

Sampel diambil dengan *purposive random sampling* lalu dikelompokkan menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok 5x usapan, 10x usapan, 20x usapan dan 30x usapan pengusapan dilakukan pada semua subjek secara serial dengan jarak antar kelompok pengusapan selama satu minggu

Variabel bebas penelitian ini adalah jumlah usapan pada mukosa bukal. Variabel terikat penelitian ini adalah kuantitas DNA yang diekstraksi dari *buccal swab*. Pada keempat kelompok penelitian dilakukan pengolahan dan analisis data secara studi analitik mengenai perbedaan kuantitas DNA dari setiap kelompok usapan.

HASIL

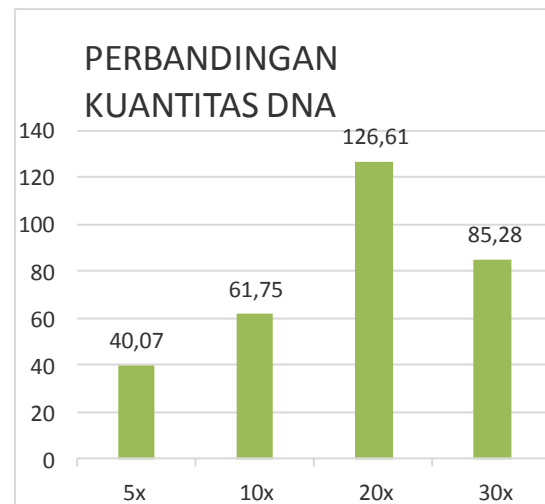
Karakteristik Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan total 44 sampel yang diambil dari 11 orang subjek. Deskripsi jumlah sampel setiap kelompok ditampilkan pada tabel berikut:

		N
Jumlah Usapan	5x	11 (25%)
	10x	11 (25%)
	20x	11 (25%)
	30x	11 (25%)
	Total	44 (100%)

Setelah dilakukan pengusapan sampel diekstraksi dengan metode chelex kemudian hasil ekstraksi dikuantifikasi menggunakan *Nanodropspectrophotometer 200*. Perbandingan kuantitas DNA setiap kelompok usapan dapat dilihat pada grafik berikut:

	Perbedaan Rerata
5 vs 10	17.88 (p:0.018)
5 vs 20	66.49(p:0.000)
5 vs 30	40.70(p:0.000)
10 vs 20	48.60(p:0.000)
10 vs 30	22.81(p:0.003)
20 vs 30	25.79(p:0.001)



Dari pengukuran didapatkan kelompok usapan 5x, 10x, dan 20x menunjukkan peningkatan kuantitas DNA yang searah dengan peningkatan jumlah usapan yaitu 5x usapan dengan rerata 52.88 ng/ μ l, 10x usapan dengan rerata 70.77 ng/ μ l dan 20x usapan dengan rerata 119.38 ng/ μ l. Pada setiap perbandingan setiap kelompok usapan didapatkan juga hasil kebermaknaan yang berbeda-beda yaitu pada kelompok 5x vs 10x didapatkan nilai kebermaknaan 0.018 sedangkan pada kelompok 5x vs 20x dan 10x vs 20x didapatkan nilai kebermaknaan 0.000 hal ini menunjukkan bahwa kelompok dengan selisih jumlah usapan yang lebih besar menunjukkan nilai kebermaknaan yang lebih. Hal ini dapat disebabkan karena semakin banyak epitel yang terambil dari setiap penambahan jumlah pengusapan.⁶⁹

Pada pengusapan 20x dan 30x didapatkan penurunan kuantitas DNA yang berbanding terbalik dengan jumlah usapan. Hal ini dapat disebabkan karena efektifitas maksimal dari alat pengusap yang digunakan telah mencapai titik maksimal pada 20x usapan sehingga penambahan usapan tidak meningkatkan kuantitas DNA yang diekstraksi. Pada pengusapan berlebih, juga menyebabkan meningkatnya produksi saliva yang dapat mempengaruhi kuantitas DNA¹⁰¹¹ dan semakin banyak pengusapan meningkatkan kemungkinan terambilnya kontaminan seperti bakteri dan sisa makanan yang dapat menyebabkan degradasi DNA dalam sampel¹². Mukosa bukal juga dapat mengalami iritasi pada pengusapan terlalu banyak oleh karena itu perlu diperhatikan jumlah usapan yang optimal dalam pengambilan sampel¹³

Kemurnian sampel dalam penelitian ini (260/280) lebih rendah dari rentang yang diharapkan dengan rerata kemurnian 1.32 (n 1.8-2.0)¹⁴ hal ini dapat disebabkan karena adanya kontaminasi protein dalam sampel¹⁵, sampel tidak homogen, kuantitas DNA yang terlalu rendah, perubahan PH sampel¹⁶, perubahan akurasi gelombang¹⁶ dan komposisi nukleotida dalam sampel¹⁷. Kemurnian sampel merupakan indikator terhadap kualitas sampel namun tidak banyak berpengaruh terhadap perhitungan kuantitas, indikator kuantitas DNA adalah fungsinya dalam pemeriksaan selanjutnya. Perlu diperhatikan bahwa dalam beberapa peristiwa walaupun kemurnian DNA berada dalam rentang yang diinginkan namun tetap ada permasalahan dalam sampel.

DNA yang diperoleh dari buccal swab dalam penelitian ini mempunyai rentang variabilitas yang tinggi antar kelompok pengusapan maupun antar individu dengan kuantitas DNA terendah 17.8 ng/ μ l dan kuantitas DNA tertinggi 170.0 ng/ μ l hal ini dapat disebabkan karena perbedaan degradasi DNA pada setiap sampel, perbedaan diet dan gaya hidup yang menyebabkan perbedaan dalam pengelupasan mukosa bukal, perbedaan flora normal pada setiap individu yang sangat bervariasi dan kebiasaan dalam kebersihan mulut setiap individu yang berbeda-beda. Variasi antar sampel lebih nyata ditemukan dalam sampel buccal swab dibandingkan dengan sampel darah yang lebih stabil karena tidak mengandung flora normal, oleh karena itu direkomendasikan dalam berbagai penelitian untuk memperhatikan berbagai teknik dalam sampling untuk mengambil sampel dengan kuantitas yang optimal dalam penelitian dengan *buccal swab* untuk mengatasi berbagai variasi dari sampel tersebut.¹⁸

Kelemahan penelitian ini adalah sampel terlalu sedikit, alat yang digunakan tidak spesifik *human* DNA (lebih disarankan menggunakan human quantifiler) dan dalam penelitian ini tidak diteliti faktor lain yang mempengaruhi kuantitas DNA dengan buccal swab seperti jenis kelamin, kebiasaan merokok, penyakit metabolik, dan lain sebagainya.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Terdapat perbedaan kuantitas DNA dari buccal swab dengan jumlah usapan yang berbeda dengan 20x usapan menunjukkan kuantitas DNA yang optimal.

Saran

Pada penelitian selanjutnya disarankan dilakukan penelitian dengan jumlah sampel yang lebih besar dan menggunakan alat dan reagen yang lebih spesifik *human DNA*. Disarankan dilakukan penelitian lanjutan dengan meneliti faktor lain yang mempengaruhi kuantitas DNA dalam *buccal swab*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Yoni S. DNA FORENSIK. Bandung: Sagung Seto; 2012. 131 p.
2. Buttler J. Fundamentals of Forensic DNA Typing. Maryland USA: Elsevier; 2009. 519 p.
3. Pertiwi KR. Penerapan Teknologi DNA dalam Identifikasi Forensik. 2012;
4. Milne E, Milne E, Bockxmeer FM Van, Robertson L, Brisbane JM, Ashton LJ, et al. Buccal DNA collection: Comparison of buccal swabs with FTA cards Short Communication Buccal DNA Collection: Comparison of Buccal Swabs with FTA Cards. 2006;(APRIL).
5. Cheng T, Chen S, Lu T, Chen W, Sher J, Shieh Y. Optimal DNA Extraction from Buccal Swab Samples. 2010;30(4):149–54.
6. Freeman B, Smith N, Curtis C, Hockett L, Mill J, Craig IW. DNA from Buccal Swabs Recruited by Mail: Evaluation of Storage Effects on Long-term Stability and Suitability for Multiplex Polymerase Chain Reaction Genotyping. 2003;33(1):67–72.
7. Mulot C, St I, Clavel J, Beaune P, Loriot M. Collection of Human Genomic DNA From Buccal Cells for Genetics Studies: Comparison Between Cytobrush, Mouthwash, and Treated Card. 2005;3:291–6.
8. Walker AH, Najarian D, White DL, Jaffe JM, Kanetsky PA, Rebbeck TR. Collection of Genomic DNA by Buccal Swabs for Polymerase Chain Reaction-Based Biomarker Assays. 1999;107(7):517–20.
9. I Meulenbelt, S Droog, G J Trommelen, D I Boomsma PES. High Yield Noninvasive Human Genomic DNA Isolation Method for Genetic Studies in Geographically Dispersed Families and Population. 2008;1252–4.
10. Saftlas AF, Waldschmidt M, Logsdon-Sackett N, Triche E, Field E. Optimizing Buccal Cell DNA Yields in Mothers and Infants for Human Leukocyte Antigen Genotyping. 2004;160(1):77–84.

11. Nedel F, André DDA, Oliveira IO De. BUCCAL CELLS SUBMITTED TO THREE DIFFERENT. 2009;17(2):113–5.
12. Woo JG, Sun G, Haverbusch M, Indugula S, Martin LJ, Broderick JP, et al. Quality assessment of buccal versus blood genomic DNA using the Affymetrix 500 K GeneChip. 2007;5:1–5.
13. Cristian M, Conde M, Beatriz S, Tarquinio C, Demarco FF. Comparison Between DNA Obtained From Buccal Cells of the Upper and Lower Gutter Area. 2009;20:275–8.
14. Scientific T. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3 . 7 User ' s Manual.
15. In C, Acidity S, Accuracy W, The OF, Mix N, Your IN. 260/280 and 260/230 Ratios. 1975;
16. william W. Wilfinger, karol Mackey piotr C. Effect of PH and Ionic Strength on the spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. Biotechnology.
17. Although V, Uv A. Determination of DNA Concentration and Purity by Ultraviolet Spectrophotometry. :2–5.
18. Livy A, Lye S, Jagdish CK. Evaluation of Quality of DNA Extracted from Buccal Swabs for Microarray Based Genotyping. 2012;27(3):28–33.