

PERBEDAAN KUANTITAS DNA YANG DIEKSTRAK DARI AKAR RAMBUT BERBAGAI FASE PERTUMBUHAN

Valensha Yosephi¹, Tuntas Dhanardono², Saebani²

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

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

ABSTRAK

Latar belakang: Rambut merupakan spesimen biologis yang sering ditemukan di Tempat Kejadian Perkara (TKP). Pemeriksaan forensik biasanya menggunakan cara pemerolehan rambut untuk memperkirakan kuantitas *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang akan didapatkan. Belum ada penelitian di Indonesia mengenai perbedaan kuantitas DNA yang diekstrak dari masing-masing fase pertumbuhan akar rambut.

Tujuan: Menganalisis perbedaan kuantitas DNA yang diekstrak dari akar rambut berbagai fase pertumbuhan.

Metode: Penelitian observasional dengan rancangan *cross sectional* ini menggunakan sampel akar rambut (n=15) yang mencakup tiga fase akar rambut, yaitu fase anagen (n=5), fase katagen (n=5), dan fase telogen (n=5). Penggolongan fase akar rambut dilakukan melalui pemeriksaan mikroskopis. Semua sampel diekstraksi dengan metode Chelex, lalu DNA dikuantifikasi menggunakan Nanodrop. Uji statistik yang digunakan adalah One-way Anova dan dilanjutkan Post Hoc Tamhane untuk melihat perbedaan antarkelompok.

Hasil: Kuantitas DNA ekstraksi dari akar rambut tiap fase adalah sebagai berikut fase anagen memiliki rerata 28,78 ng/ μ l, fase katagen memiliki rerata 7,35 ng/ μ l, dan fase telogen memiliki rerata 3,84 ng/ μ l. Pada penelitian didapatkan perbedaan yang bermakna antara tiap kelompok fase akar rambut ($p < 0,001$), yaitu fase anagen dan katagen ($p = 0,025$), fase anagen dan telogen ($p = 0,015$), dan fase katagen dan telogen ($p = 0,014$).

Simpulan: Terdapat perbedaan bermakna kuantitas DNA yang diekstrak dari akar rambut pada berbagai fase pertumbuhan akar rambut.

Kata Kunci: Kuantitas DNA, fase akar rambut, anagen, katagen, telogen

ABSTRACT

THE DIFFERENCE OF EXTRACTED DNA QUANTITY OF VARIOUS HAIR ROOTS PHASES

Background: Hair is a biological specimen that is often found in crime scene investigation. Forensic examination usually classify hair based on the acquisition method to estimate the quantity of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained. There are no studies in Indonesia that had uncover the differences in extracted DNA quantity from each growth phase of the hair roots.

Objective: To analyze the differences in the extracted DNA quantity from the various hair root phases.

Methods: The study was an observational study with cross sectional design using samples of hair roots (n = 15) that includes three phases of hair root growth, namely the anagen phase (n = 5), the phase catagen (n = 5), and the telogen phase (n = 5). The classification of the hair root phases is done through microscopic examination. All samples were extracted with Chelex, the DNA was quantified using the NanoDrop. The statistical test used is the One-way ANOVA and Post Hoc Tamhane to see the difference between groups.

Results: The average quantity of DNA extracted from each hair root phases are 28.78 ng/ μ l for anagen phase, 7.35 ng/ μ l for catagen phase, and 3.84 ng/ μ l for telogen phase. There were significant differences between groups of the hair roots phases ($p < 0,001$). The significant differences were found between the anagen and catagen phases ($p = 0,025$), anagen and telogen phases ($p = 0,015$), and catagen and telogen phases ($p = 0,014$).

Conclusions: There are significant differences in the extracted DNA quantity from the various hair root phases.

Keywords: DNA quantity, hair root phase, anagen, catagen, telogen

PENDAHULUAN

Identifikasi DNA sering disebut juga DNA *profiling/fingerprinting* merupakan karakterisasi satu atau lebih fitur unik pada genom individu. Dasar dari pemeriksaan ini adalah bahwa setiap individu memiliki DNA yang berbeda dan unik.^{1,2} DNA adalah suatu polimer nukleotida (polinukleoti DNA pada sel tubuh manusia dapat dibedakan menjadi DNA inti (nDNA) yang terdapat dalam semua sel berinti dan DNA mitokondria (mDNA).³ Laboratorium forensik di dunia saat ini lebih umum melakukan pemeriksaan DNA inti dibandingkan DNA mitokondria) yang berisi informasi genetik yang terdapat di dalam sel.^{1,3,4}

Berbagai bagian tubuh manusia dapat digunakan sebagai sampel untuk pemeriksaan DNA, di antaranya adalah darah, bercak darah, tulang, ketombe, gigi, rambut dengan akar, batang rambut, feses, kuku, sidik jari, sekret hidung dan telinga, saliva, semen, bercak semen, keringat, urin, dan barang-barang pribadi seperti sikat gigi dan jam tangan.² Rambut merupakan spesimen biologis yang sering ditemukan di TKP. Rambut yang ditemukan biasanya merupakan rambut rontok yang dalam siklus pertumbuhan rambut berada dalam fase telogen.^{5,6} Pemeriksaan forensik biasanya menggunakan cara pemerolehan rambut untuk memperkirakan kuantitas DNA yang akan didapatkan. DNA yang didapatkan dari rambut berakar melalui pencabutan langsung menghasilkan 1 – 750 ng/akar, sedangkan DNA yang berasal dari rambut rontok menghasilkan 1 – 10 ng/akar.²

Penilaian kualitas akar rambut melalui pemeriksaan mikroskopis tergolong mudah untuk dilakukan. Melalui pemeriksaan mikroskopis, dapat ditentukan fase pertumbuhan akar rambut (anagen, katagen, atau telogen) sebelum dilakukan metode ekstraksi dan identifikasi DNA. Sampai saat ini, belum ada penelitian di Indonesia mengenai perbedaan kuantitas DNA yang diekstrak dari masing-masing fase pertumbuhan akar rambut. Perbedaan kuantitas yang bermakna dari tiap fase pertumbuhan akar rambut dapat menjadi alternatif dalam memperkirakan kuantitas DNA dari sampel rambut yang ditemukan.

METODE

Penelitian ini adalah penelitian observasional dengan rancangan penelitian *cross sectional*. Sampel yang digunakan adalah sampel rambut yang memiliki akar, diambil dari seorang individu secara langsung dengan syarat, yaitu berasal dari individu yang tidak sedang mengalami penyakit rambut dan kulit kepala, merupakan jenis rambut terminal yang diambil dari daerah kepala, memiliki warna rambut dengan spektrum coklat sampai hitam, dan tidak pernah mengalami perawatan rambut artifisial seperti pengecatan, *bonding*, dan *smoothing*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro untuk pemeriksaan mikroskopis, ekstraksi, dan kuantifikasi DNA inti dari sampel akar rambut. Penelitian ini dilakukan pada bulan April-Mei 2016.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah akar rambut dalam berbagai fase pertumbuhan. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kuantitas DNA yang dapat diekstrak. Sampel akar rambut akan dimasukkan ke dalam tiga kelompok fase pertumbuhan, yaitu fase anagen, fase katagen, dan fase telogen melalui pemeriksaan mikroskopis dimana setiap fase terdiri dari 5 sampel. Setiap sampel dibersihkan dengan air yang sudah didestilasi kemudian dipotong sepanjang 4 mm dari pangkal proksimal untuk mendapatkan bagian akar saja. Sampel lalu diekstraksi menggunakan metode Chelex untuk kemudian dikuantifikasi DNA menggunakan spektrofotometer Nanodrop.

Data yang diperoleh diolah dengan program komputer SPSS 23.00 dan diuji normalitas dengan *Saphiro Wilk* karena besar sampel kurang dari 50. Bila distribusi data normal, dilakukan uji hipotesis, yaitu uji parametrik *One Way Anova*, dilanjutkan dengan Post Hoc. Hasil dikatakan bermakna bila $p < 0,05$.

HASIL

Berikut merupakan tabel hasil pengukuran kuantitas DNA menggunakan spektrofotometer Nanodrop:

Tabel 1. Pengukuran Kuantitas DNA

NO	NAMA SAMPEL	FASE AKAR RAMBUT	DATA PENGUKURAN		KEMURNIAN
			xi	x	
1	AA	ANAGEN	25,0	25,00	1,82
			25,0		1,86
			25,0		1,68
2	AI	ANAGEN	14,2	14,30	1,73
			14,9		1,41
			13,8		1,62
3	AM	ANAGEN	31,3	30,37	1,44
			30,2		1,47
			29,6		1,53
4	AN	ANAGEN	32,9	32,67	1,48
			32,5		1,50
			32,6		1,47
5	AO	ANAGEN	41,1	41,57	1,46
			42,0		1,43
			41,6		1,39
6	KA	KATAGEN	9,2	9,03	1,35
			8,8		1,47
			9,1		1,45
7	KI	KATAGEN	6,9	6,67	1,19
			6,6		1,02
			6,5		1,05
8	KM	KATAGEN	8,5	8,37	1,87
			8,0		1,64
			8,6		1,70
9	KN	KATAGEN	4,9	4,93	1,38
			5,0		2,66
			4,9		1,52
10	KO	KATAGEN	7,9	7,77	1,11
			7,8		1,12
			7,6		1,14
11	TA	TELOGEN	4,7	4,50	1,82
			4,2		1,64
			4,6		1,46
12	TI	TELOGEN	4,9	4,87	0,96
			4,6		0,95
			5,1		1,24
13	TM	TELOGEN	2,4	2,33	67,87
			2,3		111,32
			2,3		2,44
14	TN	TELOGEN	3,8	3,87	0,88
			4,3		0,90
			3,5		0,76
15	TO	TELOGEN	3,8	3,63	1,110
			3,5		1,33
			3,6		0,99

Analisis statistik kuantitas DNA telah memenuhi asumsi normalitas Shapiro-Wilk untuk fase anagen ($p=0,958$), fase katagen ($p=0,730$), dan fase telogen ($0,686$). Uji hipotesis parametrik yaitu uji One-way Anova dilakukan untuk mengetahui kebermaknaan pada perbedaan kuantitas DNA antarkelompok fase akar rambut.

Tabel 2. Perbandingan kuantitas DNA antara fase akar rambut

		n	Rerata (s.b) ng/ μ l	p
Fase akar rambut	Anagen	5	28,782 (10,06)	$p<0,001^*$
	Katagen	5	7,354 (1,61)	
	Telogen	5	3,840 (0,98)	

p = nilai kebermaknaan; *Uji One way Anova. Analisis post hoc dapat dilihat pada Tabel 10

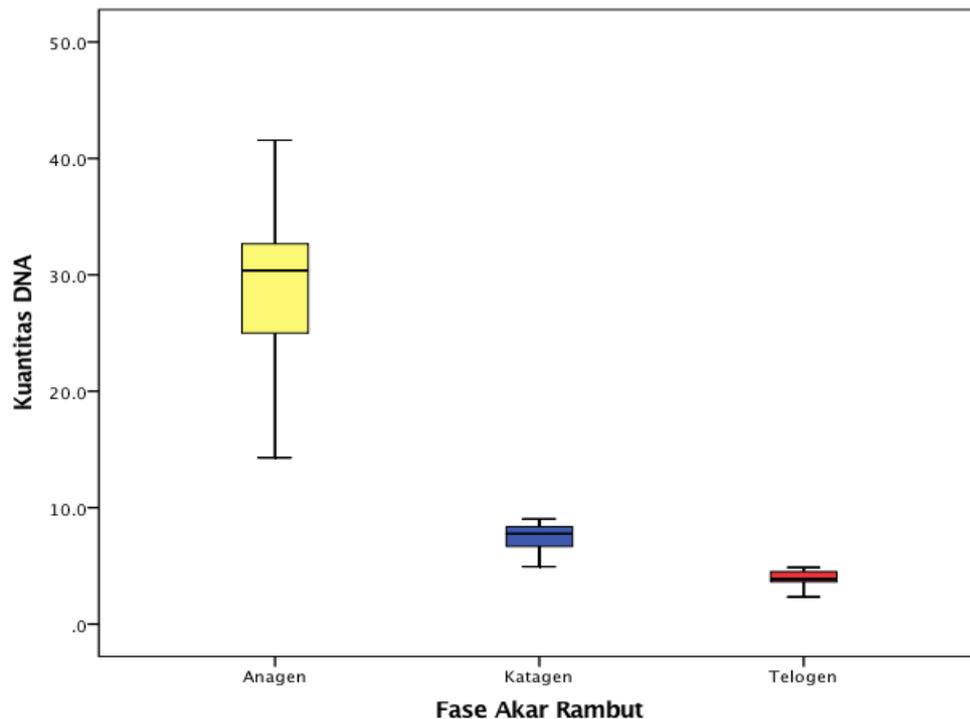
Nilai $p<0,001$ didapatkan dari uji One-way Anova maka dapat disimpulkan terdapat perbedaan bermakna pada kuantitas DNA antara semua fase akar rambut. Pada uji Levene, didapatkan $p=0,018$ ($p<0,05$) maka dapat disimpulkan bahwa paling tidak terdapat dua kelompok yang memiliki varian berbeda. Oleh karena itu, untuk melihat perbedaan pada tiap kelompok fase akar rambut dilakukan uji lanjutan Post Hoc Tamhane yang ditampilkan dalam tabel berikut:

Tabel 3. Analisis post hoc perbandingan kuantitas DNA antar kelompok fase akar rambut

	Perbedaan rerata	IK 95%		Nilai p
		Minimum	Maksimum	
Anagen vs katagen	21,43	3,96	38,89	0,025
Anagen vs telogen	24,94	7,31	42,57	0,015
Katagen vs telogen	3,51	0,84	0,84	0,014

p=nilai kebermaknaan; *Uji Post Hoc Tamhane

Tabel 3 menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antarkelompok fase akar rambut, baik kelompok anagen dengan katagen ($p=0,025$), kelompok anagen dengan telogen ($p=0,015$), dan kelompok katagen dan telogen ($p=0,014$). Perbedaan kuantitas DNA antara tiap kelompok dapat dilihat pada gambar di bawah ini:



Gambar 1. Boxplot Kuantitas DNA terhadap Fase Akar Rambut

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antar kuantitas DNA yang diekstrak dari akar rambut masing-masing fase pertumbuhan, baik fase anagen, katagen, dan telogen. Fase anagen memiliki rerata kuantitas DNA hasil ekstraksi yang paling tinggi. Hasil ekstraksi tertinggi kedua adalah fase katagen. Fase telogen memiliki kuantitas DNA hasil ekstraksi paling rendah. Hasil penelitian ini sejalan dengan teori dan penelitian-penelitian mengenai DNA rambut sebelumnya.

John Butler (2010) dalam bukunya “*Fundamentals of Forensic DNA Typing*” menyebutkan bahwa rambut yang dicabut secara langsung akan memiliki rentangan kuantitas DNA yang lebih besar dibandingkan rambut rontok (1-750 ng/akar dibandingkan dengan 1-10 ng/akar). Akar rambut dalam fase pertumbuhan anagen dan katagen hanya didapatkan dengan mencabut rambut hingga akar, sedangkan akar rambut dalam fase telogen dapat ditemukan dari rambut yang dicabut maupun rambut yang rontok secara alami.

Penelitian yang sejenis pernah dilakukan oleh Andreasson, *et al.* (2006). Ia menguantifikasi DNA inti dan DNA mitokondria dari berbagai material forensik, yaitu rambut rontok, rambut yang dicabut, rambut ketiak, rambut alis, rambut janggut, dan swab

epitel. Hasil kuantifikasi nDNA dan mtDNA dinyatakan dalam jumlah kopi per sampel. Ditemukan bahwa rambut yang dicabut memiliki jumlah kopi DNA yang lebih tinggi.⁷ Dalam penelitian ini, Andreasson juga menyebutkan bahwa terdapat variasi hasil kuantitas DNA yang sangat besar pada akar rambut yang dicabut.⁷ Hasil ini juga ditemukan pada penelitian dimana hasil kuantifikasi paling tinggi sebesar 41,6 ng/ μ l dan paling rendah sebesar 14,3 ng/ μ l, dengan rata-ratanya adalah 28,78 ng/ μ l.

Secara histologis, akar rambut dalam fase anagen, terdiri dari sel-sel hidup. Papila dermis berisi stroma mukopolisakarida, cabang saraf dan loop kapiler yang aktif. Di atas papilla dermis terdapat sel-sel progenitor rambut dan disekitar papilla dermis terdapat bulbus rambut. Bagian bulbus adalah bagian yang aktif memproduksi rambut. Selubung akar dalam dan selubung akar luar membentuk folikel rambut. Selubung akar luar merupakan reservoir dari stem sel yang multipotent, yaitu stem sel keratinosit dan melanosit. Selubung akar luar (inner root sheath/IRS) mencakup tiga lapisan, yaitu lapisan Henle, Huxley, dan lapisan kutikula. Lapisan kutikula selubung akar dalam membatasi kutikula dari batang rambut, menjangkari batang rambut pada folikel rambut. Sel-sel pada selubung akar dalam membatasi batang rambut dan selubung akar luar.⁸

Pada masa transisi antara fase anagen dan telogen, akar rambut memasuki fase katagen. Pada fase ini, pembelahan sel di matriks rambut berhenti, aktivitas pembuatan pigmen dari melanosit berhenti, produksi batang rambut telah selesai, dan dasar dari batang rambut menjadi terkeratinisasi seluruhnya.⁹ Bulbus rambut mulai terdegenerasi dan folikel menjadi lebih pendek. Folikel rambut juga mengalami regresi melalui apoptosis yang menyebabkan pengurangan kira-kira 1/6 dari diameter normalnya.⁸ Inilah yang menyebabkan pada ekstraksi DNA, hasil kuantifikasi lebih rendah dibandingkan fase anagen namun lebih tinggi dibandingkan telogen.

Sebaliknya, akar rambut dalam fase telogen memasuki masa istirahat (*resting*). Pada fase inilah terjadi melanosit dan selubung akar dalam berkurang.⁸ Terjadi proses keratinisasi seluruhnya kuantitas DNA pada fase telogen.¹⁰

Pada penelitian ini, dapat diamati pada tabel 8 yang merangkum hasil pengukuran kuantitas DNA menggunakan spektrofotometer nanodrop bahwa nilai kemurnian/*purity* sampel bervariasi. Kemurnian dari suatu sampel dilihat dari perbandingan absorbansi DNA pada panjang gelombang 260 nm dan absorbansi protein pada panjang gelombang 280 nm (A260/A280). Nilai yang dianggap baik sesuai dengan pedoman teknis dari Nanodrop adalah

~1,8.^{11,12} Pada penelitian ini, peneliti melakukan pembacaan ulang kuantitas DNA menggunakan nanodrop, tetapi tidak terdapat perbaikan pada nilai kemurnian. Terdapat beberapa hal yang dapat mempengaruhi hasil ini, seperti kemungkinan kontaminasi dari protein saat proses ekstraksi, homogenisasi sampel yang kurang, alat nanodrop yang digunakan kurang bersih sehingga saat pengukuran absorbansi terganggu, dan metode *pipetting* yang kurang tepat saat mengambil sampel. Namun, nilai kemurnian ini tidak membuat hasil ekstraksi menjadi tidak valid karena pembacaan terhadap DNA tetap dilakukan pada panjang gelombang 260 nm.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Pada penelitian ini, terdapat perbedaan bermakna kuantitas DNA yang diekstrak dari akar rambut pada berbagai fase pertumbuhan akar rambut. Akar rambut dalam fase anagen memiliki kuantitas DNA ekstraksi yang paling tinggi dengan rerata yaitu 28,78 ng/ μ l. Akar rambut dalam fase katagen memiliki kuantitas DNA yang lebih tinggi dibandingkan fase telogen dengan rerata yaitu 7,35 ng/ μ l. Akar rambut fase telogen memiliki kuantitas DNA ekstraksi paling rendah dibandingkan fase anagen dan katagen, dengan rerata yaitu 3,84 ng/ μ l.

Saran

Untuk pengembangan selanjutnya, dapat diadakan penelitian serupa dengan jumlah sampel yang lebih besar dan penelitian yang mencakup variabel perancu yang dapat mempengaruhi kuantitas DNA tiap fase sesuai perhitungan sampel untuk penelitian genetik. Selain itu, proses ekstraksi dilakukan lebih hati-hati sehingga kontaminasi dapat diminimalkan sehingga nilai kemurnian (*purity*) dari kuantifikasi dapat lebih baik. Dapat pula dicoba beberapa metode ekstraksi lainnya seperti fenol kloroform dan *salting out* yang dapat memberikan perbandingan nilai.

DAFTAR PUSTAKA

1. Syukriani Y. DNA Forensik. Jakarta: Sagung Seto; 2012.
2. Butler JM. Fundamentals of Forensic DNA Typing. Fundam Forensic DNA Typing [Internet]. 2010;363–96. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749994000163>
3. National Institute of Health US. Cells and DNA. 2015;
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. From DNA to RNA [Internet]. Garland Science; 2002 [cited 2016 Jan 15]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26887/>
5. Deedrick DW. FBI — Hairs, Fibers, Crime, and Evidence, Part 1 [Internet]. Forensic science communication. 2000 [cited 2016 Jan 16]. Available from: <https://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2000/deedric1.htm/>
6. Nilsson M, Budowle B, Andre H, Lundberg H, Allen M. Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. 2006;164:56–64.
7. Andréasson H, Nilsson M, Budowle B, Lundberg H, Allen M. Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. Forensic Sci Int [Internet]. 2006;164(1):56–64. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073805006250>
8. Buffoli B, Rinaldi F, Labanca M, Sorbellini E, Trink A, Guanziroli2 E, et al. The human hair: from anatomy to physiology. Int J Dermatol [Internet]. 2014 [cited 2016 Jan 9];331–41. Available from: <http://moscow.sci-hub.bz/da4e6f76349ede9dcc6ba53561db52cb/10.1111%40ijd.12362.pdf>
9. Harkey MR. Anatomy and physiology of hair. Forensic Sci Int. 1993;63(1-3):9–18.
10. Friis C, Olsen ME, Ørsted L, Bertelsen MF, Willerslev E, Tobin DJ, et al. DNA from keratinous tissue . Part I: Hair and nail. Ann Anat [Internet]. Elsevier GmbH.; 2012;194(1):17–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2011.03.013>
11. Identification C. Assessment of Nucleic Acid Purity. Thermo Fish Sci [Internet]. 2012; Available from: <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>
12. Thermo Scientific. 260/280 and 260/230 Ratios. 2008;1–2. Available from: <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop 1000-&-NanoDrop 8000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>