

OPTIMALISASI REAGEN FLORANCE IODINE DALAM PENGUJIAN KOLIN DAN KETAHANAN ASAM BASA UNTUK DETEKSI CAIRAN MANI

Farah Primadani Kaurow¹, M Ikbal Pangestu²

¹Universitas Yarsi/ RS Bhayangkara Tk.1 Pusedokkes Polri

²Mahasiswa Departemen Kimia, Institut Teknologi Sepuluh Nopember
farahkaurow@gmail.com

Abstrak

Deteksi cairan mani dalam kedokteran forensik sangat penting untuk pembuktian adanya kasus pidana, khususnya pada kasus kekerasan seksual, khususnya kasus persetubuhan. Kristal kolin dapat diketahui dalam konsentrasi tinggi pada cairan mani menggunakan pengujian Florance iodine (FI). Uji FI ini telah digunakan dalam ilmu forensik selama bertahun-tahun, namun sangat sedikit yang didokumentasikan mengenai optimalisasi, ketahanan dan masa kadaluwarsa reagen FI tersebut dalam praktik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui optimalisasi konsentrasi iodine pada Reagen FI termasuk dengan ketahanan asam basa. Uji optimalisasi konsentrasi didapatkan bahwa konsentrasi optimum iodine pada reagen FI adalah 10%, didapatkan pula ketahanan reagen FI pada pH asam adalah 1 dan pada pH basa adalah 8. Reagen Florance Iodine merupakan salah satu metode kimia yang digunakan dalam forensik untuk mendeteksi keberadaan cairan mani melalui reaksi dengan kolin. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan penggunaan reagen Florance Iodine dengan mengevaluasi sensitivitas dan spesifisitasnya dalam berbagai kondisi asam-basa. Pengujian dilakukan dengan variasi pH dan konsentrasi reagen untuk menentukan parameter yang paling efektif dalam menghasilkan perubahan warna yang jelas dan spesifik. Hasil penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan akurasi metode deteksi forensik, terutama dalam kondisi sampel yang telah mengalami degradasi lingkungan.

Kata Kunci : Kedokteran Forensik, Kristal kolin, FI, Spektroskopi Raman, FT-IR, Kekerasan Seksual, Air mani (semen)

Abstract

Detection of seminal fluid in forensic medicine is very important for proving criminal cases, especially in cases of sexual violence, particularly intercourse. Choline crystals can be found in high concentrations in seminal fluid using the Florance iodine (FI) test. This FI test has been used in forensic science for many years, but very little has been documented about the optimization, resistance and expiration date of the FI reagent in practice. This study aims to determine the optimal concentration of iodine in the FI reagent, including acid-base resistance. The concentration optimization test found that the optimum concentration of iodine in the FI reagent was 10%, and the FI reagent was resistant to acid at pH 1 and base at pH 8. Florance Iodine reagent is a chemical method used in forensics to detect the presence of seminal fluid through reaction with choline. This study aims to optimize the use of Florance Iodine reagent by evaluating its sensitivity and specificity under various acid-base conditions. The test was carried out with variations in pH and reagent concentrations to determine the most effective parameters in producing clear and specific color changes. The results of this study are expected to improve the accuracy of forensic detection methods, especially in sample conditions that have experienced environmental degradation.

Keywords: Forensic Medicine, Choline Crystals, FI, Raman Spectroscopy, FT-IR, Sexual Violence, Semen.

PENDAHULUAN

Pemeriksaan forensik terhadap korban kekerasan seksual merangkum luasnya ilmu kedokteran forensik, dibandingkan pemeriksaan pada situasi/ kasus lain dalam praktik forensik. Analisis terhadap cedera dan materi biologis, baik pada korban hidup atau korban mati memerlukan pendekatan ilmiah yang sistematis untuk mendiagnosis secara tepat serta memastikan nilai bukti yang kuat untuk digunakan di persidangan (Lincoln, 2018; Ladd, 2023). Penanganan kasus kekerasan seksual memerlukan kerja sama beberapa pihak untuk mengawal proses investigasi yang dimulai dari tempat kejadian perkara hingga ke ruang persidangan. Pada umumnya, penanganan kasus kekerasan seksual tidak lepas dari pemeriksaan dan analisis terhadap cairan tubuh (Nick Dawnay et al, 2023). Teknik klasik, seperti metode enzimatik, serologis, dan histologis menggunakan mikroskop, telah menjadi modalitas utama selama bertahun-tahun dalam mengidentifikasi cairan tubuh. (Gamblin et al, 2019).

Pemeriksaan terhadap air mani merupakan salah satu barang bukti biologis dari cairan tubuh yang paling sering diperiksa oleh ahli. Analisis terhadap air mani dan/ atau nodula air mani dapat memberikan data penting dalam proses investigasi, terutama jika ditemukan di tempat kejadian perkara. (Nautiyal et al, 2023). Cairan mani merupakan senyawa campuran hasil sekresi dari sedikitnya empat kelenjar urogenital pria. Kelenjar vesikula seminalis menyumbang sekitar 60% dari campuran ini, kelenjar prostat menyumbang sekitar 30%, dan gabungan kontribusi dari kelenjar epididimis dan bulboourethralis menyumbang 10% sisanya. Air mani mengeluarkan bau yang unik saat masih segar, sedangkan nodula air mani yang sudah kering berwarna kuning pucat hingga abu-abu dan terkadang kaku dan berkilau. Namun, jika jumlah dan lokasi pengendapan air mani tidak jelas, dianjurkan untuk menggunakan perangkat sumber cahaya dengan panjang gelombang yang variabel (Sakurada K et al, 2020) (Noureddine 2011).

Pada umumnya, mayoritas sampel yang diserahkan ke laboratorium untuk deteksi dan analisis air mani adalah dari swab dan pakaian atau kain. Kolin diketahui terdapat dalam konsentrasi tinggi dalam air mani, dan uji Iodin Florence (FI) untuk deteksi kolin telah digunakan dalam ilmu forensik selama bertahun-tahun, namun sangat sedikit yang terdokumentasikan mengenai optimalisasi dan ketahanan asam

basanya (Hardinge et al, 2013). Uji FI digunakan untuk mendeteksi adanya kolin, suatu amina jenuh kuaterner dengan rumus kimia $(CH_3)_3N + CH_2CH_2OH$. Kolin adalah nutrisi penting dan ditemukan di banyak bahan makanan, tetapi terutama terkonsentrasi pada daging dan produk susu. Hal ini juga ditemukan dalam banyak cairan tubuh tetapi pada konsentrasi yang jauh lebih rendah daripada yang ditemukan dalam air mani (2-300 mg/100 g) (Hardinge et al, 2013; Kai Yi, 2022).

Setelah Pada tahun 1895 dan 1896, Dr. Florence di Lyon menerbitkan serangkaian makalah yang menceritakan studinya tentang cairan mani dan identifikasi mediko-legalnya. Sebagian besar materi membahas isolasi dan pengenalan sel sperma dalam pewarnaan mani dalam penyelidikan. Dalam makalah ketiga, tes Florence yang sekarang dikenal diperkenalkan. DR. Florence tidak membuat klaim yang berlebihan untuk tesnya, dan tampaknya menganggapnya sebagai tes dugaan yang berguna untuk menghemat waktu yang diperlukan dalam melakukan pencarian yang cermat terhadap cairan mani di setiap nodula mani yang dicurigai. Reagen terdiri dari 1,65 g KI dan 2,54 g yodium dalam 30 ml air. Jumlah yodium dapat dikurangi setengahnya tanpa efek perubahan yang signifikan. Tes ini ternyata cukup sensitif, dan selalu diperoleh dengan nodula mani. Kristal kolin tidak terbentuk oleh lendir hidung atau vagina, urin, keringat, air liur, air mata, susu, cairan otak atau keputihan, atau dengan beberapa sampel semen hewan yang diuji (Gamblin et al, 2019; Hobbs et al 2010).

Temuan ini mengkonfirmasi hasil Florence, yang menyatakan bahwa darah, nanah, sekret hidung dan vagina dan sekret uretra tidak memberikan tes positif terhadap mani. Johnston mencatat bahwa dia telah melakukan beberapa upaya untuk mengidentifikasi zat aktif dalam air mani tetapi tidak dapat melakukannya. Pengujian biasanya dilakukan pada kaca objek mikro, sampel diletakkan pada tempatnya, kaca penutup ditambahkan, dan reagen dibiarkan berdifusi di bawah kaca penutup. Kristal mulai terbentuk pada antar muka cairan, dan diidentifikasi secara visual dengan pemeriksaan mikroskopis (Chia-Tzu et al, 2021).

Pada tahun 2017 hardinge melakukan penelitian terhadap optimalisasi pengujian kolin menggunakan reagen florence iodine, termasuk sensitivitas dan spesifisitas komparatif dengan tes psa dan ap, kemudian didapatkan hasil tes FI jauh

lebih disukai daripada kit PSA Seratec® untuk identifikasi cairan mani karena meskipun sensitivitasnya lebih rendah, ia memiliki spesifisitas yang jauh lebih besar (Hardinge et al, 2013).

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan populasi adalah pendonor dengan kriteria inklusi pendonor diminta untuk menahan diri dari hubungan seksual sebelum memberikan cairan mani. Sampel dalam penelitian ini adalah sampel yang berasal dari cairan tubuh yaitu cairan mani yang dikumpulkan dan disimpan pada suhu ruang. Tahapan dalam penelitian ini dimulai dari tahap persiapan sampel, preparasi reagent, pengujian reagent, uji-uji ini bertujuan untuk mengetahui optimalisasi konsentrasi iodine pada reagen FI serta ketahanan dan masa kadaluwarsa reagen FI.

METODE

- A. Alat dan Bahan. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mortar, alu, pipet tetes, timbangan, gelas ukur, cawan, object glass, cover glass, mikroskop. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalium iodin, iodida, aquades, cairan mani, H₂SO₄ dan NaOH.
- B. Donor Sampel. Pendonor diminta untuk menahan diri dari hubungan seksual sebelum memberikan cairan mani. Sampel semen diperoleh dari donor yang berbeda untuk tes optimalisasi FI. Semua sampel dikumpulkan dengan persetujuan yang diinformasikan sepenuhnya.
- C. Persiapan Sampel. Sampel cairan mani yang telah dikumpulkan dioleskan ke gelas objek menggunakan transport swab secara roll dengan ukuran luas 1x1 cm, setelah sampel dioleskan didiamkan selama 1 menit kemudian bagian yang telah dioleskan cairan mani ditutup menggunakan cover glass atau B glass.
- D. Preparasi Reagen. Reagen FI (FI) dibuat dengan cara melarutkan padatan kalium iodida 1 gram dan padatan halus iodine mulai dari 0 – 2,75 gram dengan aquades sampai diperoleh volume total 10 ml sehingga konsentrasi kalium iodide yang didapatkan 10% dan variasi konsentrasi iodine 0% - 27,5 % dengan kenaikan konsentrasi setiap variasi adalah 2,5 % sehingga didapatkan 11 macam variasi reagen.

E. Protokol Test

- 1) Uji Kolin menggunakan Reagen FI. Eksperimen optimalisasi dilakukan dengan cara sampel yang telah disiapkan sebelumnya ditetaskan dengan reagen FI melalui sela antara *cover glass* dengan *object glass*, kemudian dilakukan pemeriksaan dengan mikroskop dengan pembesaran 10x dan dilakukan pengulangan sebanyak 11x (variasi dari reagen FI) dan dilakukan selama 5 hari berturut turut dengan sampel cairan mani yang sama. Hasil dari setiap pengujian didokumentasi kemudian dilakukan uji panelis dengan ahli dengan 6 dokter spesialis forensik di Rumah Sakit Bhayangkara Tk.1 Puskokes Polri untuk menentukan konsentrasi reagen FI yang optimum.
- 2) Uji Ketahanan Asam Basa. Pengujian ini dilakukan sesuai dengan metode yang dilakukan oleh Kai Yi dkk pada tahun 2022 dalam 0300-9440/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved, dengan cara Reagen FI yang telah disiapkan dengan konsentrasi iodine sesuai hasil pengujian optimalisasi reagen FI di masukkan kedalam tabung reaksi kemudian untuk pengujian asam ditetaskan dengan asam sulfat sedikit demi sedikit dan diukur pH dari reagen tersebut kemudian pada pH 6,4,2, dan 0,5 dilakukan pemeriksaan reagen FI dengan cara melakukan uji dengan sampel cairan mani yang telah disiapkan kemudian diperiksa dengan mikroskop. Untuk pengujian basa ditetaskan dengan NaOH sedikit demi sedikit dan diukur pH dari reagen tersebut kemudian pada pH 8 dan 10 dilakukan pemeriksaan reagen FI dengan cara melakukan uji dengan sampel cairan mani yang telah disiapkan kemudian diperiksa dengan mikroskop (Kai Yi et al, 2022).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimalisasi Reagen FI

- 1) Batas Konsentrasi Iodine pada Reagen FI
Sampel cairan mani yang telah disiapkan sebelumnya di tetaskan dengan reagen FI dimulai dari konsentari 0%-maksimum konsentrasi melalui sela antara cover glass dengan object glass, kemudian dilakukan

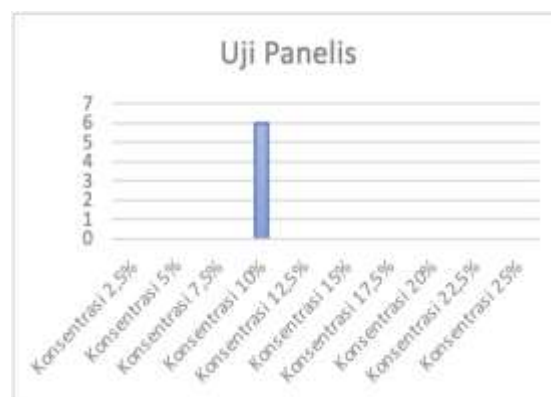
pemeriksaan dengan mikroskop dengan pembesaran 10x dan dilakukan pengulanya sebanyak 11x (variasi dari reagen FI) dan dilakukan selama 5 hari berturut turut dengan sampel cairan mani yang sama.

Pengujian tersebut didapatkan hasil seperti yang terdapat pada lampiran 1 yaitu pada konsentrasi 2% tidak terlihat terbentuknya kristal kolin periodida, pada konsentrasi 2,5% terlihat sedikit tetapi sangat jelas kristal kolin periodida, pada konsentrasi 5% terlihat banyak dan sangat jelas kristal kolin periodide, pada konsentrasi 7,5% terlihat banyak dan sangat jelas kristal kolin periodide, pada konsentrasi 10% terlihat banyak dan sangat jelas kristal kolin periodide, pada konsentrasi 12,5% terlihat banyak dan sangat jelas kristal kolin periodide, pada konsentrasi 15% terlihat banyak dan sangat jelas kristal kolin periodide, pada konsentrasi 17,5% terlihat banyak dan sangat jelas kristal kolin periodide, pada konsentrasi 20% terlihat banyak tetapi kurang jelas kristal kolin periodide, pada konsentrasi 22,5% terlihat banyak tetapi kurang jelas kristal kolin periodide, pada konsentrasi 25% terlihat sedikit dan kurang jelas kristal kolin periodide, pada konsentrasi 27,5% sudah tidak terlihat terbentuk nya kristal kolin periodida bahwa batas minimal konsentrasi iodine pada reagen FI adalah 2,5% hal ini disebabkan karena pada konsentrasi iodine 2% tidak didapatkan kristal kolin pada pengujian menggunakan mikroskop, hal ini disebabkan karena reaksi pada reagen FI terhadap cairan mani adalah iodin akan teroksidasi menjadi I₂ dan kholin akan tereduksi sehingga akan mengendap dan mengabsorb I₂ sehingga akan terbentuk kristal kholin periodida, karena hal tersebut maka jika konsentrasi iodine kurang tidak dapat membentuk kristal kolin. Hal ini sesuai dengan penelitian yang pernah dilakukan oleh Dr Florence pada tahun 1895 bahwa pengurangan hingga setengah dari konsentrasi awal iodine yaitu 7,5% tidak berpengaruh secara signifikan. Kemudian didapatkan juga konsentrasi maksimum iodine pada reagen FI adalah 25% hal ini disebabkan karena pada konsentrasi iodine 27,5% tidak terlihat atau tidak didapatkan kristal kolin pada pengujian sampel cairan mani, hal ini disebabkan karena jika

konsentrasi iodine terlalu besar maka akan merusak dari sampel cairan mani tersebut sehingga tidak didapatkan kristal kolin.

2) Konsentrasi Optimum Iodine pada Reagen FI

Pada pengujian kali ini dilakukan uji panelis dengan 6 dokter spesialis forensik RS. Polri Bhayangkara Tk. I R. Said Sukanto dengan cara memberikan kuisioner berisikan data hasil uji batas konsentrasi iodine pada reagen FI yaitu dari konsentrasi 2,5%-25% didapatkan hasil kuisioner pada lampiran 2 dan diolah sehingga menghasilkan data seperti pada gambar 3.1.

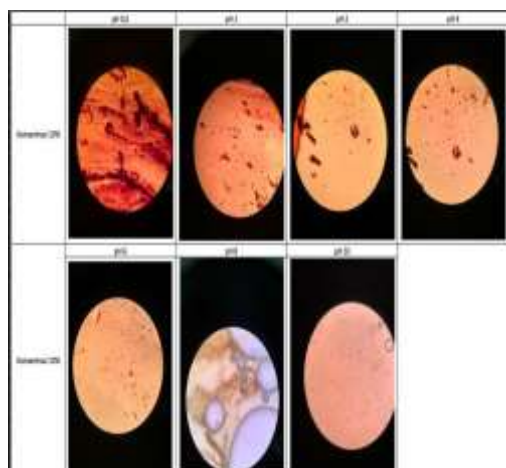


Gambar 3.1 Diagram hasil uji panelis

Seperti yang dilihat pada gambar 3.1 didapatkan hasil bahwa konsentrasi optimum iodine pada reagen FI menurut 6 dokter spesialis forensik RS. Polri Bhayangkara Tk. I R. Said Sukanto adalah sebesar 10% hal ini disebabkan karena pada konsentrasi 10% menghasilkan terlihatnya kristal kolin yang konsisten banyak mulai dari pengujian pada hari pertama cairan mani sampai dengan hari kelima cairan mani.

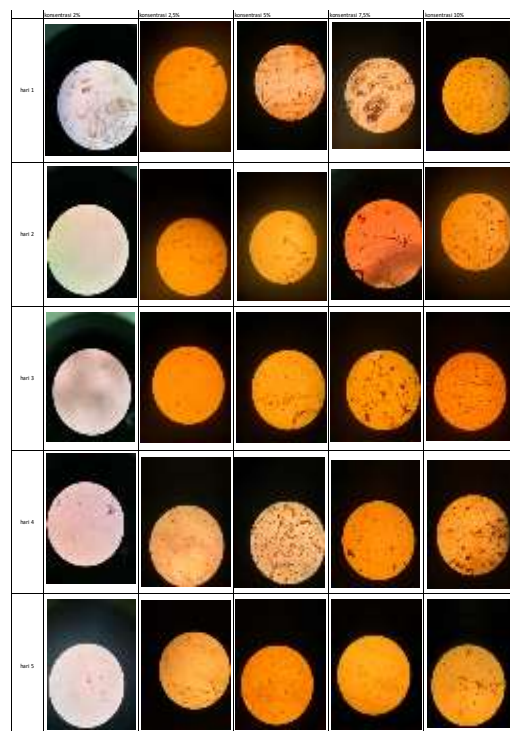
Uji Ketahanan Asam Basa

Sampel cairan mani yang telah disiapkan sebelumnya di teteskan dengan reagen FI yang telah disiapkan dan diukur pH sesuai dengan metodologi uji ketahanan asam basa melalui celah antara *cover glass* dengan *object glass* dengan konsentrasi iodine pada reagen FI sebesar 10% sesuai dengan hasil pengujian optimal konsentrasi iodine pada reagen FI, kemudian didapatkan hasil seperti pada gambar 3.2.



Gambar 3.2 Hasil pengujian ketahanan asam basa

Seperti yang dapat dilihat pada gambar 3.2 didapatkan hasil ketahanan reagen FI terhadap asam basa yaitu reagen FI dengan konsentrasi 10% pada pH 0,5 tidak terlihat terbentuknya kristal kolin periodide, pada pH 1 masih terlihat bahwa terdapat bentuk kristal kolin periodide walaupun pada pH 1 hanya terlihat 4 batang kristal kolin periodida, pada pH 2 terlihat bahwa terdapat bentuk kristal kolin periodide walaupun pada pH 2 masih terlihat hanya 8 batang kristal kolin periodide, pada pH 4 terlihat bahwa terdapat lebih banyak bentuk kristal kolin periodida yaitu sebanyak 12 batang kristal kolin periodida, pada pH 6 terlihat bahwa terdapat lebih banyak bentuk kristal kolin periodide berbentuk kecil dan terlihat dengan sangat jelas dan besar 2 batang kristal kolin periodide, pada pH 8 masih terlihat bahwa terdapat bentuk kristal kolin periodide walaupun pada pH 8 hanya terlihat 6 batang kristal kolin periodida, pada pH 10 sudah tidak terlihat terbentuknya kristal kolin periodide, sehingga dapat disimpulkan bahwa reagen FI dapat bertahan dalam suasana asam hingga pH 1 dikarenakan pada pH 0,5 tidak terlihat terbentuknya kristal kolin pada pengujian dengan cairan mani menggunakan mikroskop sedangkan pada pH 6, 4, 2, 1 didapatkan bentuk kristal kolin periodida pada pengujian dengan cairan mani menggunakan mikroskop dan didapatkan juga reagen FI dengan konsentrasi 10% dapat bertahan pada suasana basa hingga pH 8 dikarenakan pada pH 10 tidak terlihat bentuk kristal kolin periodida pada pengujian menggunakan cairan mani pada mikroskop. sedangkan pada pH 8 didapatkan bentuk kristal kolin periodida pada pengujian dengan cairan mani menggunakan mikroskop.



Keterangan : uji konsentrasi 0% - 10% reagen FI hari ke 1- 5



Keterangan : uji konsentrasi 12,5% - 27,5% reagen FI hari ke 1- 5

SIMPULAN

Pengujian terhadap optimalisasi reagen florance iodine dalam pengujian kolin, termasuk ketahanan dan masa kadaluwarsa telah dilakukan dan didapatkan kesimpulan bahwa :

1. Konsentrasi optimum iodine pada reagen florance iodine (FI) untuk pengujian kolin adalah dengan konsentrasi iodine 10%
2. Batas bawah konsentrasi iodine pada reagen FI adalah dengan konsentrasi iodine 2,5% dan batas atas konsentrasi iodine pada reagen FI adalah dengan konsentrasi iodine 25%.
3. Reagen FI dapat bertahan pada suasana asam hingga pH 1 dan reagen FI dapat bertahan pada suasana basa hingga pH 8.

Penelitian ini membuktikan bahwa reagen Florance Iodine dapat digunakan secara optimal dalam mendeteksi keberadaan kolin sebagai indikator utama cairan mani. Melalui serangkaian pengujian, ditemukan bahwa reagen ini memiliki tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi, terutama dalam kondisi pH tertentu. Hasil eksperimen menunjukkan bahwa stabilitas reaksi dapat ditingkatkan dengan pengaturan konsentrasi iodine yang tepat, sehingga memungkinkan deteksi yang lebih akurat dalam berbagai kondisi lingkungan.

Ketahanan reagen terhadap perubahan asam-basa juga menjadi faktor kunci dalam efektivitas metode ini. Uji stabilitas menunjukkan bahwa reagen Florance Iodine tetap memberikan hasil yang jelas pada rentang pH tertentu, meskipun keberadaan faktor eksternal seperti suhu dan oksidasi dapat memengaruhi intensitas reaksi warna. Hal ini menunjukkan pentingnya standar prosedur dalam aplikasi forensik agar hasil analisis tetap konsisten dan dapat diandalkan dalam berbagai situasi investigasi.

Dengan optimalisasi yang telah dilakukan, penggunaan reagen Florance Iodine dapat menjadi metode deteksi cairan mani yang lebih efektif dalam bidang forensik. Namun, penelitian lebih lanjut masih diperlukan untuk meningkatkan ketahanan dan keandalan reagen ini terhadap faktor lingkungan yang lebih ekstrem. Selain itu, pengujian lebih luas terhadap sampel yang beragam akan membantu memvalidasi temuan ini dan memastikan aplikasinya dalam berbagai skenario investigasi kriminal.

DAFTAR PUSTAKA

Hardinge, P., Allard, J., Wain, A., & Watson, S. (2013). Optimisation of choline testing using FI reagent, including comparative sensitivity and specificity with PSA and

AP tests. *Science & Justice*, 53 (1), 34–40.

Hobbs, M. M., Steiner, M. J., Rich, K. D., Gallo, M. F., Warner, L., & Macaluso, M. (2010). Vaginal swab specimen processing methods influence performance of rapid semen detection tests: A cautionary tale. *Contraception*, 82 (3), 291-295.

Kai, Y., Fu, S., & Huang, Y. (2022). Nanocellulose-based superhydrophobic coating with acid resistance and fluorescence. *Progress in Organic Coatings*, 168.

Ladd, M., & Seda, J. (2023). Sexual assault evidence collection. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Lincoln, C. A. (2018). Sexual assault: Forensic examination in the living and deceased. *Academic Forensic Pathology*, 8 (4), 912-923.

Nautiyal, K., & Sharma, S. (2023). Forensic examination of semen and seminal stains: A review. *AIP Publishing AIP Conference Proceedings*, 2558, 020047.

Nick, D., & Sheppard, K. (2023). From crime scene to courtroom: A review of the current bioanalytical evidence workflows used in rape and sexual assault investigations in the United Kingdom. *Science & Justice*, 63 (2), 206-228.

Noureddine, M. (2011). Forensic tests for semen: What you should know. Available from: <https://forensicresources.org/2011/forensic-tests-for-semen-what-you-should-know/>

Sakurada, K., Watanabe, K., & Akutsu, T. (2020). Current methods for body fluid identification related to sexual crime: Focusing on saliva, semen, and vaginal fluid. *Diagnostics*, 10(9), 693.

Gamblin, A. P., & Morgan-Smith, R. K. (2019). The characteristics of seminal fluid and the forensic tests available to identify it. *WIREs Forensic Science*.

Chia-Tzu, H., Li-Chin, T., Kuo-Lan, L., Nu-En, H., Yu-Hsuan, C., & Hsing-Mei, H. (2021). Overview of methods for vaginal fluid identification. *Forensic Science Journal*, 20 (1), 33-42.