

- TOOTH
- SEX DETERMINATION
- AGE DETERMINATION by TEETH.

44
TKA.06/05

TESIS

**PERAN GIGI DALAM PENENTUAN JENIS KELAMIN
MENGUNAKAN AMELOGENIN DENGAN
METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)
DAN PENENTUAN USIA DENGAN
METODE *RATIO OF SCLEROSIS TO TUBULUS* (RST)**

PENELITIAN OBSERVASIONAL LABORATORIS



PRATIWI SOESILAWATI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

TESIS

**PERAN GIGI DALAM PENENTUAN JENIS KELAMIN
MENGUNAKAN AMELOGENIN DENGAN
METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)
DAN PENENTUAN USIA DENGAN
METODE *RATIO OF SCLEROSIS TO TUBULUS* (RST)**

PENELITIAN OBSERVASIONAL LABORATORIS

PRATIWI SOESILAWATI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

**PERAN GIGI DALAM PENENTUAN JENIS KELAMIN
MENGUNAKAN AMELOGENIN DENGAN
METODE *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)
DAN PENENTUAN USIA DENGAN
METODE *RATIO OF SCLEROSIS TO TUBULUS* (RST)**

PENELITIAN OBSERVASIONAL LABORATORIS

TESIS

**Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**PRATIWI SOESILAWATI
090114265**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

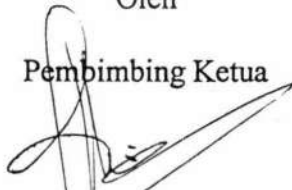
LEMBAR PENGESAHAN

TESIS INI TELAH DISETUJUI

Tanggal 27 Pebruari 2004

Oleh

Pembimbing Ketua



Dr. Istiati, drg., SU.
NIP. 130 675 683

Pembimbing



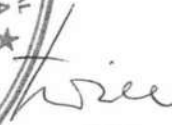
Prof. Dr. Med. Soekry Erfan Kusuma, dr, Sp F, DFM
NIP. 130 359 282

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi

Program Pascasarjana

Universitas Airlangga



DR. Trijoedani Widodo, MS., Sp KG, drg
NIP. 130 368 691

HALAMAN PENETAPAN PANITIA PENGUJI TESIS

Telah diuji pada

Tanggal 27 Pebruari 2004

Panitia penguji TESIS

Ketua : Prof. Dr. H. Ari Gunawan, dr, MS, PhD

Anggota : 1. Dr. Istiati, drg, SU

2. Prof. Dr. Med. Soekry Erfan Kusuma, dr, Sp.F, DFM

3. Dr. Mieke Sylvia MAR, drg, MS

4. Dr. R. Darmawan Setijanto, drg, M.Kes.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama dengan segala kerendahan hati saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, atas segala berkat, rahmat dan hidayahNya, sehingga tesis ini dapat saya jalani dengan segala suka-dukanya, dan diakhiri dengan selesainya penyusunan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan penghargaan dan ucapan terima kasih yang setulus-tulusnya dan setinggi-tingginya kepada :

Pemerintah Republik Indonesia, dalam hal ini Menteri Pendidikan Nasional, atas kesempatan dan bantuan dana yang diberikan melalui BPPS untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Magister Ilmu Kesehatan Gigi di Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Med. H. Puruhito, dr. SPB, TKV, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister Ilmu Kesehatan Gigi di Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Med. H. Muhammad Amin, dr., atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister Ilmu Kesehatan Gigi di Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Dekan Fakultas kedokteran Gigi Universitas Airlangga Prof. Dr. M. Rubianto, MS., SP Perio, drg., atas ijin yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program

Kepala Laboratorium Biologi Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang dijabat oleh Markus Budi Rahardjo drg, M.Kes., atas ijin yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Magister Ilmu Kesehatan Gigi di Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Dr. Istiati, drg, SU., sebagai pembimbing ketua dan guru saya yang penuh perhatian, ketulusan dan dedikasi dalam memberikan bimbingan, arahan dan perbaikan hingga tesis ini selesai, serta dorongan semangat dan dukungan untuk selalu berwawasan luas, yang kesemuanya itu merupakan sesuatu yang amat bernilai bagi saya.

Almarhum Prof. Dr. Indrayana Notosoehardjo, dr, Sp.F, sebagai pembimbing dan guru saya yang penuh kesabaran, ketulusan dan dedikasi dalam memberikan bimbingan, arahan, dan penyediaan alat serta bahan penelitian.

Dukungan beliau untuk meneliti bidang odontologi forensik ini sangat berarti bagi kemajuan ilmu saya. Semoga Almarhum beristirahat dengan tenang di sisiNya. Selamat jalan Prof...

Prof, Dr. Med. Soekry Erfan Kusuma, dr, Sp.F, sebagai pembimbing dan guru saya, atas segala bantuan dan bimbingan beliau dalam melakukan penelitian dan melakukan perbaikan tesis ini.

Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga yang dijabat oleh Dr. Soetopo, MSc., Sp.KG, drg., yang kemudian dijabat oleh Dr. Trijoedani Widodo, MS., Sp.KG, drg., atas pengarahan dan petunjuk yang diberikan kepada saya sehingga dapat menyelesaikan pendidikan Program Magister.

Dr. R. Darmawan Setijanto, drg, M.Kes., staf dari Laboratorium Ilmu Kesehatan Gigi Masyarakat Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya selaku konsultan dalam penentuan statistik dan bimbingan menyelesaikan perhitungan statistik dalam penelitian ini.

Direktur Tropical Disease Center Universitas Airlangga atas ijin dan fasilitas yang diberikan sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

Pak Chusen dan mbak Indah yang telah banyak membantu selama penelitian di Tropical Disease Center Universitas Airlangga.

Teman-teman mahasiswa Pascasarjana khususnya Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi angkatan 2001, Aris, mbak Elly, mbak An'nisaa, mbak Herna, Enny, mbak Niken, yang selalu dalam suasana persaudaraan dan keakraban sangat membantu selama saya mengikuti pendidikan Pascasarjana.

Seluruh staf Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga atas segala bantuan dan kerjasamanya.

Drg Meifianto, drg Bambang Soemarjono, M.Kes., dan staf Unit Pelayanan Terpadu Komputer Universitas Airlangga yang telah membantu dalam penelitian menggunakan program *Image Tool*.

Terimakasih yang tak terhingga kepada Ibu dan Almarhum bapak tercinta, yang telah mengasuh dan membesarkan saya. Doa, kesabaran, dorongan semangat, bantuan dan pengertian Beliau berdua adalah pegangan hidup saya. Semoga Beliau berdua mendapat limpahan Rahmat dari Allah SWT.

Terimakasih kepada almarhum bapak mertua dan ibu mertua, yang telah memberikan doa dan bantuan, semoga Allah membalas budi baik Beliau berdua.

Kakak-kakak dan adik tersayang, kel. Arief BP, Prastiti dan kel, kel. Prasetyo Saksono, kel. Agus Prabowo, atas perhatian dan bantuannya.

Kepada suami tercinta, Goenawan Wibisono dan anakku M. Alwino Bayu Firdauzy, terimakasih yang tak terhingga atas doa, pengertian, pengorbanan, bantuan dan kasih sayangnya sehingga tesis ini dapat diselesaikan. Semoga Allah selalu melimpahkan hidayahNya kepada keluarga kita. Amin.

RINGKASAN

Gigi adalah obyek utama dalam bidang Kedokteran Gigi. Gigi bukan saja memiliki arti penting pada saat individu tersebut masih hidup, seperti fungsi kunyah, bicara, dan estetik tetapi juga pada saat sudah mati. Di negara-negara berkembang, saat ini gigi dapat membantu bidang Kedokteran Forensik untuk mengidentifikasi korban kecelakaan atau pembunuhan. Pemeriksaan gigi telah menjadi titik penentu untuk identifikasi korban bila identifikasi positif tidak dapat dilakukan karena kerusakan jaringan tubuh yang parah.

Pemeriksaan gigi dalam odontologi forensik berdasar pada kemampuan gigi yang tidak mengalami perubahan *post mortem*, dan tidak terpengaruh oleh faktor *exogen*, misalnya trauma atau kebakaran.

Telah dilakukan penelitian observasional laboratoris mengenai peran gigi dalam penentuan jenis kelamin menggunakan amelogenin dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan penentuan usia dengan metode *Ratio of Sclerosis to Tubulus* (RST). Diharapkan dari penelitian ini dapat diketahui peran amelogenin dalam mendeteksi jenis kelamin seseorang untuk kebutuhan bidang Odontologi Forensik dan diketahui keakuratan metode *Ratio of Sclerosis to Tubulus* dalam penentuan usia melalui pemeriksaan gigi di bagian mahkota.

Penelitian ini dilakukan pada elemen gigi yang telah dicabut. Pada penentuan jenis kelamin dilakukan isolasi DNA dari jaringan pulpa gigi dan selanjutnya hasil isolasi DNA diperiksa dengan metode *Polymerase Chain Reaction* menggunakan *primer Amelogenin*. Pada hasil amplifikasi dilakukan elektroforesis menggunakan gel agarosa untuk visualisasi pita X dan pita Y. Untuk penentuan usia dilakukan pembuatan preparat dekalsifikasi dari mahkota gigi dengan pengecaca *Sybr Green*, dan dilakukan fotomikroskopi. Rasio sklerosis dentin dan tubulus dentin dihitung dengan program komputer *Image Tool*.

Penentuan jenis kelamin berdasar pada penampakan pita pada hasil elektroforesis berupa pita X pada 106 *basepair* dan pita Y pada 112 *basepair*.

Penentuan usia berdasar pada rasio sklerosis tubulus yang dihitung dengan perbandingan antara persentase sklerosis dentin dan persentase tubulus dentin.

Analisa data yang digunakan pada penentuan usia adalah analisa Regresi.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Isolasi DNA dari pulpa gigi yang diperiksa dengan *Primer Amelogenin* menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* dapat mendeteksi jenis kelamin seseorang.
2. Tubulus dentin pada mahkota gigi dapat digunakan sebagai penentu usia dengan menggunakan metode *Ratio of Sclerosis to Tubulus*.
3. Dari penelitian ini didapatkan persamaan untuk penghitungan usia berdasar sklerosis tubulus dentin pada mahkota gigi :

$$\text{Usia} = 11,622 + 0,419 \text{ RST}$$

ABSTRACT

It was done a laboratory observational study toward the teeth role in determining the sex using amelogenin with Polymerase Chain Reaction (PCR) and determining the age with method of Ratio of Sclerosis to Tubulus (RST). The study was done toward the teeth element which had been extracted, then there was DNA isolation to be examined with PCR method using primer Amelogenin and making teeth histology preparat to be examined with RST method. It was hoped from this study to be determine the sex and the age someone's, by examining the teeth. The determination of sex was done by reading the band X-106 basepair and Y-112 basepair to the electrophoresis result, the age determination was done by counting the ratio of dentin sclerosis and dentin tubulus, using the computer program of Image Tool. The data analysis that was used to determine the age is regression analysis. From the study result could be concluded : (1) Primer Amelogenin that was used in the PCR method to the teeth could detect someone's sex, (2) Dentin tubulus in the crown could be used in the determination of age using RST method, (3) From this study displayed equation age by counting dentinal tubulus sclerosis in the teeth crown : $Age = 11,622 + 0,419 RST$.

Keywords : Teeth, sex determination, PCR, age determination, Ratio of Sclerosis to Tubulus, dentinal tubulus.

DAFTAR ISI

Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Persetujuan	iv
Penetapan Panitia	v
Ucapan Terimakasih	vi
Ringkasan	ix
Abstrak	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Komponen Gigi	8
2.2 Penentuan Jenis Kelamin	11
2.2.1 Isolasi DNA dan Jaringan Gigi	12
2.3 Penentuan Usia	15
2.4 Metode <i>Polymerase Chain Reaction</i>	19
2.5 Metode <i>Ratio of Schlerosis to Tubulus</i>	22
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	24
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	24
3.2 Hipotesis Penelitian	29
BAB 4 METODE PENELITIAN	30
4.1 Jenis Penelitian	30
4.2 Rancangan Penelitian	30
4.3 Unit Eksperimental	30
4.4 Sampel Penelitian	30
4.4.1 Besar Sampel	30
4.4.2 Kriteria Sampel	31
4.5 Variabel Penelitian	32
4.5.1 Klasifikasi Variabel	32
4.5.2 Definisi Operasional Variabel	33
4.6 Lokasi Penelitian	34

4.7 Bahan Penelitian	34
4.8 Alat	36
4.9 Alur Penelitian	37
4.10 Analisa Data	42
4.11 Alur Penelitian	43
a. Penentuan Jenis Kelamin	43
b. Penentuan Usia	44
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	45
5.1 Hasil Penentuan Jenis Kelamin	45
5.2 Hasil Penentuan Usia	48
BAB 6 PEMBAHASAN	52
6.1 Penentuan Jenis Kelamin	52
6.2 Penentuan Usia	53
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	57
7.1 Kesimpulan	57
7.2 Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN	63

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	:	Data status jenis kelamin sampel dan hasil penentuan jenis kelamin dengan primer <i>Amelogenin</i>	45
Tabel 5.2	:	Hasil uji regresi antara <i>Ratio of Sclerosis to Tubulus</i> dan usia	50
Tabel 5.3	:	Analisa deskriptif selisih antara usia sebenarnya dan usia estimasi	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>	21
Gambar 5.1	: Hasil elektrophoresis penentuan jenis kelamin Menggunakan <i>primer Amelogenin</i> dengan isolasi DNA dari pulpa gigi	47
Gambar 5.2	: Hasil fotomikroskopi preparat histologi tubulus dentin yang diwarnai dengan bahan cat <i>Sybr Green</i>	48
Gambar 5.3	: Distribusi usia terhadap <i>Ratio of Sclerosis to Tubulus</i> .	49

BAB 1
PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang Masalah

Identifikasi manusia berdasarkan bentuk gigi dan rahang telah digunakan sejak jaman Romawi. Saat ini, dokter gigi dapat berperan sebagai sumber data yang dapat digunakan untuk menjawab pertanyaan yang timbul dalam penelusuran kematian. Dokter gigi forensik dapat menggunakan data ini untuk menarik kesimpulan yang diharapkan mempermudah dan meningkatkan kinerja penyidik (Sweet, 2001).

Gigi adalah obyek utama dalam bidang Kedokteran Gigi. Gigi bukan saja memiliki arti penting pada saat individu tersebut masih hidup, seperti fungsi kunyah, bicara, dan estetik tetapi juga pada saat sudah mati. Di negara-negara berkembang, saat ini gigi dapat membantu bidang Kedokteran Forensik untuk mengidentifikasi korban kecelakaan atau pembunuhan. Pemeriksaan gigi telah menjadi titik penentu untuk identifikasi korban bila identifikasi positif tidak dapat dilakukan karena kerusakan jaringan tubuh yang parah. Metode sitologi menggunakan kromatin X dan Y dari jaringan pulpa gigi telah umum digunakan untuk penentuan jenis kelamin dari gigi. Beberapa tahun terakhir, seiring kemajuan analisa genetik, penentuan jenis kelamin menggunakan teknik analisa DNA semakin berkembang dan telah diterapkan pada beberapa sampel forensik, termasuk diantaranya sampel gigi (Hanaoka dan Minaguchi, 1996). Penggunaan gigi sebagai sumber penting analisa forensik dengan pemeriksaan *Polymerase*

Chain Reaction (PCR) atau metode yang lain telah banyak dilaporkan oleh beberapa peneliti. Kendala utama penggunaan gigi sebagai sumber bahan adalah DNA didapat dalam jumlah kecil dan metode untuk mengambil DNA dari gigi membutuhkan biaya besar (Sivagami et al, 2000). Metode biologi molekuler telah berkembang dan meningkatkan kemampuan mendeteksi variasi genetik sampai tingkat genom untuk kepentingan klinis dan forensik (Westwood dan Werret, 1989).

Sidik jari dan identifikasi gigi adalah metode paling spesifik untuk identifikasi personal, karena gigi merupakan jaringan tubuh yang paling tahan terhadap kerusakan, dan hal ini telah dibuktikan oleh bidang arkeologi yang masih dapat mengidentifikasi seseorang setelah satu juta tahun (Griffiths, 1992). Identifikasi dalam antropologi forensik didasarkan pada beberapa tingkat penentuan, diawali dengan penentuan jenis kelamin, penentuan usia, evaluasi patung, penggolongan ras, dan penelitian odontologi (Grevin et al, 1998). Sasaran utama odontologi forensik terletak pada identifikasi mayat tak dikenal berdasarkan adanya gigi (Griffiths, 1992). Pemeriksaan gigi dalam odontologi forensik berdasar pada kemampuan gigi yang tidak mengalami perubahan *post mortem*, dan tidak terpengaruh oleh faktor *exogen*, misalnya trauma atau kebakaran (Amariti et al, 2000). Identifikasi gigi berdasar pada catatan *antemortem*, dan material *antemortem* seperti foto sinar X atau cetakan gigi, umumnya dimiliki oleh dokter gigi. Heras et al (1999) melaporkan dalam kasus kebakaran yang memakan banyak korban, pemeriksaan odontologi yang

dilengkapi radiografi dental dan analisa DNA, terbukti akurat, ekonomis dan merupakan metode yang cepat untuk mengidentifikasi korban kebakaran masal.

Erfan Kusuma (2003) dalam penelitiannya pada korban bom Bali 12 Oktober 2002, membuktikan bahwa otopsi mandibula pada korban wanita warga Korea yang didukung oleh catatan medis dokter gigi yang merawatnya masih meragukan, maka dilakukan pemeriksaan DNA menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* dengan sampel jaringan hepar korban ekstraksi darah tepi dari ayah korban. Berdasar pada bukti observasi ilmiah, disimpulkan bahwa > 99,99% darah dari ayah korban sesuai dengan sampel jaringan hepar korban.

Penggunaan gigi sebagai sumber penting dalam penentuan jenis kelamin untuk analisa forensik telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Selain gigi, penentuan jenis kelamin juga dapat dilakukan dengan isolasi DNA melalui akar rambut, darah segar, darah kering, semen, *vaginal swab* dan tulang (Westwood & Werrett, 1990). Menurut Notosoehardjo (2000) tiap jaringan mempunyai kandungan DNA yang berbeda-beda tergantung struktur serta komposisi selnya. Jaringan dengan banyak sel berinti dan sedikit jaringan ikat umumnya mempunyai kadar DNA tinggi. Pemilihan organ yang akan diisolasi DNA guna analisis kasus forensik sangatlah penting. Pada keadaan yang sudah lanjut membusuk atau apabila hanya tinggal tulang belulang, maka hanya tulang dan gigi saja yang masih dapat diperiksa.

DNA terdapat di dalam semua sel somatik yang berinti. Selain itu, sebagian besar sel manusia mengandung ratusan mitokondria dalam sitoplasmanya dan setiap mitokondria memiliki molekul DNA. Pada gigi, DNA

terdapat dalam ruang pulpa, dentin dan sementum. Ruang pulpa mengandung DNA yang cukup memadai untuk dapat diambil dari jaringan lunak dalam ruang pulpa. Jaringan lunak pulpa terdiri dari odontoblas, fibroblas, sel endotel, sel saraf perifer, sel mesenkimal yang tidak berdeferensiasi dan komponen darah yang tak berinti (Smith et al, 1993).

Protein penting yang berperan dalam penentuan jenis kelamin melalui gigi adalah amelogenin. Yaitu salah satu protein matriks mayor yang disekresi oleh ameloblast dari enamel. Gen amelogenin mengkode protein yang terletak pada kromosom X dan Y pada manusia (Sivagami et al, 2000).

Polymerase Chain Reaction sering dipergunakan untuk amplifikasi suatu segmen DNA yang terletak di antara dua daerah yang telah diketahui urutan basa DNA-nya. Teknik ini pertama-tama dipublikasikan pada tahun 1985 oleh kelompok *Cetus Corporation*. Dengan teknik ini dapat diamplifikasi invitro suatu segmen DNA yang berasal dari suatu sampel biologi yang sangat sedikit (Boehm, 1989).

Analisa gigi untuk penentuan usia telah dilakukan oleh beberapa peneliti, diantaranya Gustafson (1950) yang menggunakan lima faktor penentu yaitu abrasi, *epithelial attachment*, dentin sekunder, aposisi sementum, resorpsi akar, dan transparansi dentin di daerah akar. Metode ini masih memberikan hasil yang kurang akurat karena faktor biasanya mencapai 10 tahun. Kriteria tersebut terus berkembang serta dikombinasikan dengan berbagai formula yang dapat menginformasikan usia seseorang.

Menurut Amariti et al (2000) dentin sklerosis adalah indikator yang tepat untuk penentuan usia. Penelitiannya menggunakan preparat histologi gigi dekalsifikasi dan dilakukan fotomikrografi yang dibaca dengan program komputer khusus. Penentuan usia melalui gigi dapat diperiksa dengan metode *Ratio of Sclerosis to Tubulus* (RST) dengan pengambilan spesimen dari tubulus akar. Metode ini dilaporkan mampu menurunkan bias penentuan usia hingga 8 tahun. Beberapa peneliti melaporkan peningkatan transparansi pada dentin berhubungan dengan peningkatan usia. Fenomena ini didasarkan pada deposisi kalsium di sekitar tubulus dentin yang menyebabkan tubulus mengecil sehingga jumlah tubulus berkurang dan terjadi peningkatan sklerosis dentin. Tubulus yang mengalami mineralisasi mempunyai indeks refraksi sama dengan dentin, menyebabkan dentin menjadi lebih *transluscent* (Amariti et al, 2000; Mjor, 1996). Weber (1974) mengindikasikan setengah dari seluruh jumlah tubulus mengalami pembuntuan total disebabkan perubahan fisiologis. Swift et al (2000) melaporkan bahwa jumlah tubulus dentin berbeda-beda pada beberapa bagian gigi. Jumlah tubulus pada *dentino enamel junction* kira-kira 20.000 per mm² dan meningkat menjadi 45.000 per mm² di sekitar pulpa. Variasi regional pada struktur dentin dan komposisinya berhubungan dengan karakteristik permeabilitas pada lokasi gigi yang berbeda, dimana telah diketahui bahwa permeabilitas dentin proksimal lebih tinggi daripada dentin oklusal, dan dentin koronal lebih permeabel daripada dentin di akar.

Dari latar belakang di atas maka peneliti ingin mengetahui apakah isolasi DNA dari gigi yang diperiksa dengan metode diagnostik *Polymerase Chain*

Reaction menggunakan *primer Amelogenin* mampu menginformasikan jenis kelamin seseorang, serta apakah penentuan usia dengan metode *Ratio of Sclerosis to Tubulus* menggunakan spesimen dari tubulus dentin mahkota gigi dapat memberikan hasil lebih baik daripada spesimen tubulus dentin akar gigi, yang nantinya dapat dipakai sebagai acuan dalam penentuan usia di bidang odontologi forensik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasar pada latar belakang tersebut di atas, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah *primer Amelogenin* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* pada gigi dapat mendeteksi jenis kelamin seseorang ?
2. Apakah penghitungan tubulus dentin dengan metode *Ratio of Sclerosis to Tubulus* pada bagian mahkota gigi dapat menentukan usia seseorang ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengembangkan pengetahuan dan cara pemeriksaan gigi untuk penentuan jenis kelamin dan usia.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui peran amelogenin dengan metode *Polymerase Chain Reaction* dalam mendeteksi jenis kelamin seseorang untuk kebutuhan bidang Odontologi Forensik

2. Mengetahui keakuratan metode *Ratio of Sclerosis to Tubulus* dalam penentuan usia melalui pemeriksaan gigi di bagian mahkota.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memperoleh informasi tentang jenis kelamin seseorang secara akurat sebagai penunjang ilmu odontologi forensik.
2. Memperoleh informasi cara identifikasi usia seseorang yang lebih akurat untuk penunjang ilmu odontologi forensik

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Komponen Gigi

Gigi disusun oleh tiga jaringan mineralisasi yaitu enamel, dentin, sementum, dan pulpa. Enamel berasal dari ektodermal dan komponen lainnya berasal dari mesenkimal. Komposisi kimia enamel terdiri dari 96-97% bahan anorganik hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), 1% bahan organik, dan 3-4% air. Enamel diketahui sebagai jaringan terkeras dengan kalsifikasi tertinggi dalam tubuh manusia. Enamel matriks mengandung 65% air, sebagian kecil proteoglikan, glikosaminoglikan, lipid, sitrat dan ion anorganik. Bahan organik membentuk campuran heterogen yang berisi 20% matriks yang terbagi menjadi dua kelompok yaitu amelogenin dan enamelin. Amelogenin membentuk sebagian besar matriks, tetapi jumlahnya menurun selama proses maturasi enamel, karena adanya peningkatan komponen enamelin (van Rensburg, 1996).

Dentin mengandung jaringan mineralisasi hidroksiapatit, dimana secara mikroskopis ditemui tubulus yang memanjang dari pulpa ke *dentino-enamel junction*. Tubulus dentinal ini mengandung sitoplasma dari odontoblas yang terdapat di sekitar pulpa. Diameter tubulus dentin adalah 1-5 mm dengan rata-rata 1,5 mm. Pada daerah pulpa, tubulus ini saling berdekatan dibanding pada daerah periferal. Oleh karena itu pada bagian periferal banyak ditemui dentin intertubular. Bentuk tubulus tidak mengikuti garis lurus, tetapi terbagi menjadi dua kurvatur, yaitu kurvatur primer dan sekunder. Pada gambaran mikroskopis

gigi terlihat bahwa tubulus mengikuti kurva bentuk S menuju periferal. Kecembungan kurvatur primer terletak di daerah akar, dan kurvatur sekunder di koronal. Pada pembesaran tingkat tinggi tubulus terlihat mengikuti alur bergelombang, sebagai hasil dari pergerakan spiral odontoblas selama proses pembentukan dentin. Mendekati *dentino enamel junction*, sebagian besar tubulus bercabang menjadi dua atau lebih. Peningkatan deposisi dentin intra tubular dapat menyebabkan pembuntuan total pada lumen tubulus. Hal ini menghasilkan gambaran transparan pada dentin yang diketahui sebagai *dentin sclerotic*, yang merupakan fenomena proses penuaan, diawali dari daerah apikal dan berakhir di koronal. Komposisi dentin terdiri dari 70% bahan anorganik, 18% bahan organik yaitu kolagen, dan 12% air. Dentin adalah jaringan dengan mineralisasi tertinggi kedua setelah enamel (van Rensburg, 1996; Avery, 1988).

Bahan anorganik dentin terdiri dari kalsium fosfat berbentuk hidroksiapatit, fosfor, karbonat, magnesium, sodium, dan klorit. Bahan organik dentin dibentuk oleh protein, yang terdiri dari empat asam amino yaitu glisin, alanin, prolin, dan hidroksiprolin. Selanjutnya protein-protein tersebut tersusun menjadi kolagen. Selain itu juga ditemukan karbohidrat heksosamin pada pembentukan prosesus odontoblas dan asam sulfat mukopolisakarida di daerah peritubulus. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa karbohidrat juga berperan penting dalam proses kalsifikasi. Proses enzimatik yang terlibat dalam kalsifikasi dentin adalah enzim alkalin fosfatase yang terikat pada matriks organik dentin. Hal ini juga tampak pada predentin dan tubulus dentin (Kraus et al, 1988).

Struktur dasar dentin terdiri dari odontoblas dan matriks dentin. Prosesus odontoblas adalah juluran sitoplasma yang membentuk dentin dari protoplasma sel odontoblas. Pada beberapa tempat, prosesus odontoblas memanjang sampai enamel membentuk enamel spindel. Prosesus odontoblas diselubungi oleh sel membran. Sitoplasma dari tiap prosesus mengandung organel seperti mitokondria, endoplasmik retikulum, granula ribosoma, dan vakuola. Adanya struktur ultramikroskopi ini menunjukkan bahwa terjadi aktifitas metabolik dalam sitoplasma prosesus odontoblas. Vakuola dalam prosesus diketahui mensekresi material yang berhubungan dengan proses kalsifikasi matriks di sekitar peritubulus (Bertram et al, 1988).

Sementum hampir sama dengan tulang. Perbedaan terbesar terletak pada vaskularisasinya. Beberapa bagian dari sementum mengandung sel sementosit yang identik dengan osteosit pada tulang. Sementum mengandung 65% bahan anorganik, 23% bahan organik, dan 12% air (van Rensburg, 1996).

Pulpa adalah ruang yang terletak di tengah gigi, di dalamnya terdapat jaringan ikat, saraf, pembuluh darah dan pembuluh limfe. Pulpa dikelilingi oleh odontoblas pada bagian peripheral. Pada bagian ujung pulpa terdapat satu atau lebih foramen apikal. Di dalam pulpa ditemui sel pertahanan seperti makrofag, histiosit, dan fibrosit. Selain itu pulpa dipenuhi oleh pembuluh darah yang berasal dari arteri dentinalis. Pulpa berperan dalam proses pertumbuhan, pertahanan, sensorik, dan fungsi nutrisi. Fungsi utama dari pulpa adalah pembentukan dentin. Aktifitas ini bermula pada periode awal dentinogenesis, saat sel mesenkimal periferal berdeferensiasi menjadi sel odontoblas. Fungsi nutrisi pulpa untuk

mensuplai ion dan molekul kepada komponen organik dentin. Nutrisi pada sel odontoblas dan jaringan pulpa berfungsi untuk memelihara vitalitas gigi (Bertram et al, 1988).

2.2 Gigi Sebagai Bahan untuk Penentuan Jenis Kelamin.

Penentuan jenis kelamin menggunakan gigi adalah hal yang sulit dilakukan oleh penyidik. Perbedaan jenis kelamin berdasar gigi secara garis besar hanya berdasar pada ukuran dan bentuk gigi. Gigi pada pria umumnya lebih besar, dan pada wanita ditandai dengan kaninus yang lebih runcing dan jarak bukolingual yang tipis. Juga ditemui perbedaan ukuran antara insisif sentral dan lateral rahang atas pada wanita dibanding dengan pria (Stimson dan Mertz, 1997). Pada penentuan jenis kelamin berdasarkan pengukuran odontometrik, disimpulkan bahwa gigi kaninus berperan besar untuk penentuan jenis kelamin dalam bidang odontologi forensik, berdasarkan bentuk dan daya tahan kaninus dibanding gigi-gigi lainnya dalam susunan geligi (Lund dan Mornstad, 1999).

Elemen tulang skeletal yang mengalami trauma fisik seperti ledakan atau kebakaran, membutuhkan alat ukur yang tepat untuk penentuan jenis kelamin. Analisa DNA mampu memenuhi kebutuhan ini, terutama dalam penelitian forensik dimana sedikit kandungan DNA mampu memberikan informasi yang berguna. Sumber yang kaya DNA adalah pulpa gigi. Pulpa terlindung jaringan keras yang mampu menjaganya dari pengaruh panas. Gigi mampu bertahan pada temperatur antara 150°C – 450°C, kekuatan ini disebabkan oleh kandungan bahan anorganik gigi, yang mudah dipisahkan untuk kepentingan penelitian. Walaupun kecil, gigi-gigi tidak mungkin rusak saat tubuh mengalami kerusakan (Urbani et

al, 1999). Muller et al (1988) meneliti gigi premolar yang dipanaskan dalam tungku pada temperatur 150°C sampai 1150°C. Enamel menunjukkan keretakan pada suhu 150°C, dentin retak pada suhu 450°C, sedangkan struktur tubulus dentin dapat bertahan sampai suhu 1150°C.

2.2.1 Isolasi DNA dari Jaringan Gigi

Sylvia (1996) dalam penelitiannya menyebutkan terdapat beberapa cara isolasi DNA dari gigi yaitu penghancuran gigi total, perolehan DNA melalui tindakan endodontik, pemotongan vertikal gigi, dan pemotongan horisontal pada daerah *cementoenamel junction*. Penghancuran gigi total dan perolehan DNA melalui tindakan endodontik adalah teknik yang paling mudah dan menghasilkan DNA dengan kualitas dan kuantitas yang cukup baik untuk analisa genetik.

Menurut Smith (1993) isolasi DNA dengan penghancuran gigi total menimbulkan kerugian karena jaringan gigi akan kehilangan bentuk dan ciri-cirinya, sehingga tidak dapat dipakai untuk pengamatan lebih lanjut secara antropologi, radiografik, serta biokimia bila dibutuhkan suatu pengamatan lebih lanjut.

Sivagami et al (1999) dalam penelitiannya untuk penentuan jenis kelamin, menggunakan cara isolasi DNA melalui potongan gigi dan jaringan pulpa. Gigi direndam nitrogen cair, kemudian dihancurkan menggunakan mortar dan pestel dalam *autoclav*. Hasil bubuk selanjutnya disuspensi dan dilakukan ultrasonikasi selama 1 menit. Isolasi DNA dengan metode ini diketahui lebih efektif dari segi biaya.

Letak jaringan pulpa yang dilindungi oleh enamel dan dentin menyebabkan jaringan ini tidak terpengaruh oleh perubahan temperatur yang tinggi, misalnya pada kasus kebakaran. Sweet et al (1995) dalam penelitiannya pada korban pembunuhan dengan pembakaran, membuktikan penentuan jenis kelamin dapat dilakukan melalui isolasi DNA dari pulpa gigi. Urbani et al (1999) dalam penelitiannya tentang pengaruh temperatur terhadap penentuan jenis kelamin menggunakan analisa DNA pada pulpa gigi, membuktikan bahwa pulpa gigi yang terpapar kenaikan temperatur sampai 100°C selama 15 menit, masih dapat digunakan untuk penentuan jenis kelamin dengan kebenaran 100%, sedangkan pada gigi yang tertanam dalam tulang, pulpa gigi tidak terpengaruh oleh temperatur sampai 250°C.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Murakami et al (2000) untuk penentuan jenis kelamin pada sampel gigi yang dibiarkan dalam temperatur ruang selama 22 tahun, terendam air laut selama 1 sampai 4 minggu, tertanam dalam tanah selama 1 sampai 4 minggu, dan terpapar panas karena kebakaran sampai 200°C. Ternyata seluruh sampel menunjukkan bahwa ekstraksi DNA tetap dapat dilakukan dari pulpa gigi dan jaringan keras gigi. Demikian pula Komuro et al (2001) dalam penelitiannya tentang penentuan jenis kelamin menggunakan pulpa gigi dengan *electrophoresis locus amelogenin*, menyimpulkan bahwa jenis kelamin seluruh sampel dapat ditentukan menggunakan sampel pulpa gigi. Menurut Yamamoto (1996) ekstraksi DNA dari jaringan gigi, umumnya menggunakan jaringan pulpa gigi. Karena jaringan ini kaya pembuluh darah dan sel odontoblast.

Pada penelitian ini, peneliti menggunakan cara perolehan DNA dengan tindakan endodontik. Pada awalnya dilakukan preparasi gigi untuk mendapatkan *orifice* dari saluran akar. Selanjutnya dengan menggunakan jarum ekstirpasi dan reamer, seluruh jaringan pulpa dan odontoblas dikeluarkan, hingga didapatkan sampel jaringan pulpa sebanyak 5 mg (Hanaoka et al, 1995). Selanjutnya dilakukan isolasi DNA dengan metode *Chelex 100*. Sampel pulpa gigi ditempatkan dalam tabung plastik, ditambahkan *Chelex 100*, dan dilakukan pemanasan disertai sonikasi. Selanjutnya sampel disentrifugasi untuk memecah DNA. Pada tahap ini, *Chelex* berfungsi untuk mengikat DNA. Untuk mendapatkan DNA, sampel dipanaskan selama 10-15 menit. DNA yang didapat pada tahap ini masih terikat pada *Chelex*. Untuk memisahkan DNA dengan *Chelex*, dilakukan sentrifugasi pada 12.000 rpm selama 2 menit. Supernatan yang dihasilkan setelah centrifugasi inilah yang digunakan untuk pemeriksaan PCR.

Kemurnian dan kadar DNA ditentukan dengan evaluasi absorpsi panjang gelombang 260 nm dan 280 nm menggunakan *UV Spectrophotometer*. DNA yang telah diisolasi dengan metode *Chelex 100* dianalisis dengan *Polymerase Chain Reaction* menggunakan *Taq Polymerase* dan *Primer Amelogenin*, digandakan sebanyak 30 *cycle*. Selanjutnya hasil PCR dielektroforesis pada *agarose gel*.

Pada identifikasi jenis kelamin hasil isolasi jaringan pulpa gigi dengan teknik PCR, terlihat gambaran spesifik X pada 106 *basepair* dan Y 112 *basepair*. Bila individu berjenis kelamin pria (XY) maka pada pemeriksaan terlihat gambaran 2 band yaitu band 106 bp dan 112 bp, dan bila berjenis kelamin wanita

(XX) hanya terlihat gambaran sebuah band yaitu band 112 bp (Yamamoto, 1996; Notosoehardjo, 2001).

2.3 Gigi Sebagai Bahan Penentuan Usia

Penentuan usia melalui pemeriksaan gigi telah dilakukan oleh banyak ahli untuk menunjang pemeriksaan odontologi forensik. Fokus primer odontologi forensik terletak pada identifikasi mayat tak dikenal berdasarkan adanya gigi. Sidik jari dan identifikasi gigi adalah metode paling spesifik untuk identifikasi seseorang. Tetapi gigi adalah jaringan tubuh manusia yang paling tahan terhadap kerusakan dan telah dikenal dalam bidang arkeologi lebih dari sejuta tahun lalu (Griffiths, 1992).

Burn dan Maples (1978), melaporkan terdapat tiga parameter dalam penentuan usia berdasar gigi, yaitu formasi, degenerasi, dan histologi. Pada parameter formasi termasuk didalamnya mineralisasi gigi, pembentukan mahkota, erupsi, dan penutupan akar. Pengukuran degenerasi dilakukan dengan pengamatan keausan gigi, warna gigi, dan perlekatan periodontal. Pengamatan histologi meliputi tingkat deposisi dentin, aposisi sementum, resorpsi akar, dan transparansi akar.

Pada dentin ditemui dua tanda penuaan, yaitu pembentukan dentin sekunder secara fisiologis, dan pembuntuan pada tubulus dentin secara bertahap yang dikenal dengan *dentin sclerosis* (Mjor, 1996). *Dentin sclerotic* adalah hasil dari perubahan komposisi struktural pada awal pembentukan dentin. Pada preparat gosok terlihat gambaran putih atau transparan di bawah mikroskop cahaya.

Sklerosis dentin dapat terjadi di semua struktur dentin, dan bisa ditemui lebih dari satu tempat. Pemeriksaan histologi yang lebih dalam menunjukkan bahwa dentin sklerotik adalah pembuntuan tubulus dentin dimana tubulus dentin terisi bahan kalsifikasi. Berdasar berbagai penelitian, sklerosis tubulus dentin berhubungan dengan proses penuaan. Sebaliknya, sklerosis juga dapat disebabkan oleh stimuli eksternal misalnya erosi atau karies (Bertram et al, 1988).

Calanois et al (1970) melaporkan peningkatan transparansi dentin berhubungan dengan peningkatan usia. Fenomena ini disebabkan deposisi garam kalsium di dalam dan di sekeliling tubulus dentin, yang menyebabkan terjadinya pembuntuan tubulus dentin, dan menyebabkan penurunan jumlah tubulus dan peningkatan sklerosis tubulus dentin. Dalam hal ini, tubulus yang termineralisasi menunjukkan index refraksi yang sama dengan dentin dan dentin terlihat lebih transparan.

Gustafson (1950) pernah melakukan penentuan usia dengan analisa gigi berdasarkan enam faktor penentu yaitu abrasi, *epithelial attachment*, dentin sekunder, aposisi cementum, dan transparansi dentin di daerah akar. Kriteria tersebut selanjutnya diklasifikasi berdasar indikasi partikular dan dikombinasi menjadi rumus yang menunjukkan usia. Derajat kesalahan menggunakan metode ini mencapai 10 tahun.

Penelitian oleh Jankauskas et al (2001) dengan penghitungan *incremental lines* pada sementum akar dan membandingkannya dengan beberapa metode alternatif untuk penentuan umur, didapatkan bias antara usia sebenarnya dan usia estimasi sebesar 6,46 tahun.

Lamendin et al (1992), menemukan metode penentuan usia pada gigi akar tunggal, berdasar pengukuran pada dua hal yaitu periodontosis (P) dan transparansi akar (T). Pengukuran dilakukan pada permukaan labial gigi, tanpa perlu dilakukan pemotongan gigi, tanpa alat khusus, dan tidak diperlukan pelatihan khusus. Dari pemeriksaan yang dilakukan pada 306 gigi yang telah diketahui usia, jenis kelamin dan rasnya, didapatkan rumus penentuan usia sebagai berikut :

$$\text{Usia} = 0,18 \times P + 0,42 \times T + 25,53$$

Dengan rumus ini didapatkan angka bias sebesar 8 tahun antara usia kronologis dan usia estimasi.

Penelitian oleh Ohtani et al (1996) tentang perubahan asam aspartat pada kolagen dentin gigi sulung dan gigi permanen. Rasio rasemisasi asam aspartat pada gigi sulung meningkat setara dengan peningkatan usia, dan nilai rasio di bagian mahkota lebih tinggi daripada bagian akar.

Baccino et al (1999) menguji tujuh metode penentuan usia yang dilakukan pada gigi akar tunggal, ujung sternum pada tulang rusuk keempat, permukaan *simphisis pubis*, dan pembentukan tulang kortikal femur. Ternyata didapatkan hasil bahwa penentuan paling tepat adalah menggunakan pengukuran gigi menggunakan rumus Lamendin, pada populasi dewasa berumur di atas 25 tahun.

Amariti et al (2000) mempublikasikan hasil penelitiannya untuk penentuan usia menggunakan metode *Ratio of Sclerosis to Tubulus* (RST) dengan bantuan

preparat histologi dari tubulus akar gigi dan penghitungan tubulus menggunakan program komputer, mendapatkan rumus penentuan usia sebagai berikut :

$$\text{Usia} = \text{RST} \times 5,3 - 2,28$$

Dengan rumus ini didapatkan angka bias sebesar 8 tahun antara usia kronologis dan usia estimasi.

Pada tahun 2002, Prince dan Ubelaker menguji ketepatan rumus *Lamendin* pada populasi dengan perbedaan skeletal dibanding populasi sampel *Lamendin*. Ternyata pada populasi yang berbeda, rumus *Lamendin* memberikan bias 8,2 tahun.

Harris dan McKee (1990), meneliti karakteristik mineralisasi gigi pada kaum kulit hitam dan kulit putih di Amerika Selatan. Ternyata mineralisasi pada wanita berkembang lebih cepat daripada pria. Dan mineralisasi pada kaum kulit hitam terbentuk 5% lebih cepat daripada kaum kulit putih.

Perubahan gigi yang tidak hanya disebabkan oleh faktor usia, tetapi juga disebabkan oleh keausan karena penyakit sistemik, tingkat kebersihan mulut, dan kebiasaan. Perubahan pada enamel yang disebabkan oleh proses menua dipengaruhi oleh peningkatan konsentrasi nitrogen dan fluorid. Perubahan pada dentin ditandai dengan menyempitnya ruang pulpa. Pembentukan dentin sekunder tampak jelas pada atap pulpa dan ujung akar. Perubahan lain pada dentin adalah sclerosis sebagai lanjutan pertumbuhan dentin tubuler. Perubahan ini menyebabkan penurunan sensitivitas dentin pada usia lanjut. Tanda lain yang

muncul adalah peningkatan jumlah sabut kolagen, terutama pada mahkota gigi (Barnes dan Walls, 1994).

2.4 Metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction merupakan suatu teknik analisis DNA maupun RNA, merupakan teknik yang sederhana dan teknik baru yang berkembang pesat. Metode PCR ditemukan oleh Mullis et al (Taylor cit Mertaniasih, 2000). *Polymerase Chain Reaction* adalah teknik amplifikasi suatu segmen DNA secara in vitro dengan primer spesifik untuk amplifikasi dari rantai DNA target sebagai *template*, secara simultan sehingga DNA copy dari target meningkat secara eksponensial yaitu 2^n DNA copy (Crawford cit Mertaniasih, 2000).

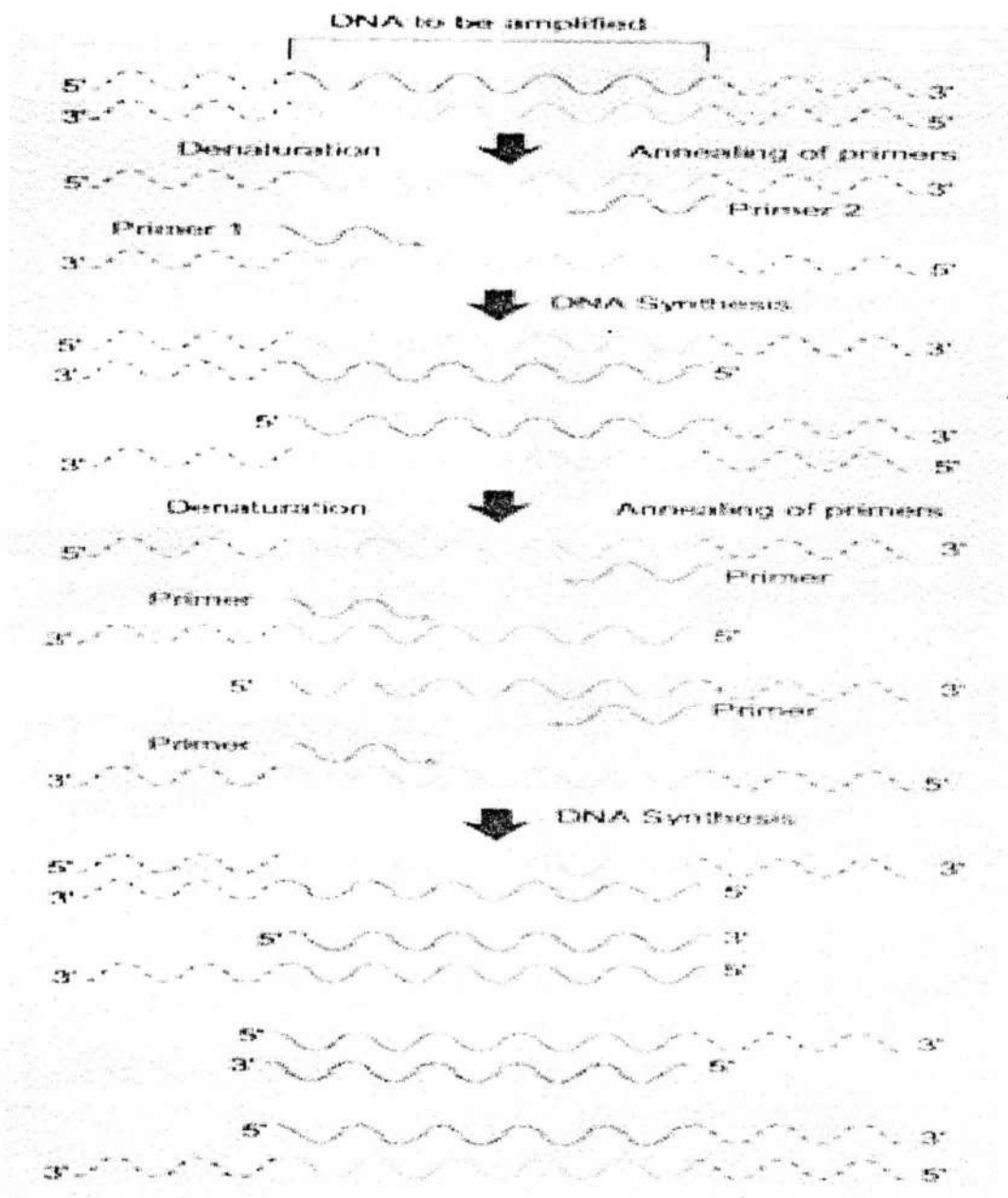
PCR adalah teknik yang mensintesis DNA secara in vitro dengan proses enzimatik, menggunakan dua *oligonukleotida primer* yang menghibridisasi rantai tunggal dari arah yang berlawanan dengan arah DNA target. Perbanyak DNA melalui siklus berulang secara berseri yang melibatkan denaturasi DNA *template*, penempelan primer pada DNA *template* dan proses perpanjangan DNA (*extention*) akan menghasilkan fragmen DNA spesifik. Oleh karena primer dan enzim polimerase tersedia secara berlebihan, maka produk dari siklus pertama dapat berfungsi sebagai *template* untuk siklus berikutnya, dan proses berlangsung demikian seterusnya. Sehingga bila dilakukan amplifikasi fragmen DNA sebanyak 20 kali siklus, maka hasil dari PCR akan mencapai jutaan kali fragmen asal (2^{20}). Pengenalan enzim baru yang tergolong termostabil *DNA polymerase (taq*

polymerase) yang diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* menjadikan PCR suatu teknik yang sederhana, yang dapat diotomatisasi dengan menggunakan *Thermocycler*. Komponen reaksi yang umum terdiri dari: *DNA template*, *Primer*, *Taq Polymerase*, *dNTP* dan *PCR buffer*.

Amplifikasi secara sederhana dapat dilakukan dalam suatu tabung reaksi (*ependorf*). Hasil amplifikasi sangat ditentukan oleh kualitas enzim, konsentrasi Mg^{++} dari *PCR buffer* dan profil dari program amplifikasi.

Spesifisitas PCR dapat dianalisa dengan mengevaluasi produk dari fragmen target dibandingkan dengan produk yang lain dengan elektroforesis. Faktor lain yang ikut mempengaruhi homogenitas dari produk PCR adalah konsentrasi dari sekuen DNA target. Penggunaan *Taq polymerase* tidak hanya mempermudah prosedur PCR, akan tetapi juga meningkatkan spesifisitas hasil PCR. Temperatur optimum untuk *taq polymerase* adalah $75^{\circ}C$, namun penggunaannya dapat lebih tinggi dan tidak mengaktivasi enzim tersebut. Meningkatnya spesifisitas dari *taq* PCR meningkatkan pula produk dari fragmen yang diamplifikasi dengan mengurangi kompetisi dari produk yang bukan target dari enzim itu. Walaupun teknik PCR pada mulanya ditujukan untuk memperbanyak kopi dari suatu gen spesifik, ternyata teknik ini dapat digunakan dalam diagnosis, analisis genetik, evolusi biologi, dan lain-lain.

Faktor yang mempengaruhi reaksi PCR diantaranya peralatan harus dibakukan, mutu kontrol harus baku; suhu, waktu dan seri pemanasan; konsentrasi *Taq polymerase*; konsentrasi dNTP; struktur dan jumlah primer; sampel DNA (Prihatini, 2000).



Gambar 2.1 *Polymerase Chain Reaction* (Edvotek, Inc, 2001).

2.5 Metode *Ratio of Sclerosis to Tubulus*

Hampir setengah abad setelah penemuan penentuan usia dengan metode Gustafson, metode ini masih terus dipakai karena dapat diterapkan dengan teknik modern dengan berbagai pendekatan. Beberapa peneliti telah mengembangkan berbagai metode berdasar pada metode Gustafson.

Ratio of Sclerosis Tubulus (RST) adalah metode yang dikembangkan oleh Amariti et al (2000) untuk menghitung jumlah tubulus dentin yang mengalami sklerosis karena proses penuaan. Metode ini menggunakan prosedur histologi untuk mendapatkan preparat dekalsifikasi gigi yang selanjutnya dicat dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* dan dilakukan fotomikrografi dengan pembesaran 1000 X. Hasil fotomikrografi selanjutnya ditransformasi menggunakan *scanning* ke komputer yang akan memisahkan warna menjadi 256 *grey tones* (Kolltveit et al, 1998). Artinya hasil gambaran akan berwarna hitam dan putih melalui prosedur matematis yang terkomputerisasi menggunakan perangkat lunak khusus. Hasil akhir menunjukkan gambaran putih adalah tubulus dan gambaran hitam adalah sklerosis. Program komputer secara langsung akan menghitung luas area hitam yang menggambarkan area sklerosis dentin dan luas area putih yang menggambarkan tubulus.

Pada penelitian ini, peneliti melakukan penghitungan tubulus dentin pada mahkota gigi. Karena proses sklerosis dentin diawali di bagian akar dan berakhir di bagian koronal (Jansen et al, 1996). Elemen gigi yang memenuhi syarat dipotong pada servikal gigi, kemudian dilakukan dekalsifikasi menggunakan teknik *USE* (Notosoehardjo, 2001). Selanjutnya dilakukan proses histologi untuk

mendapatkan potongan gigi dengan tebal 3-4 mikron. Preparat kemudian diwarnai dengan bahan *Sybr Green*, yaitu bahan pengecatan spesifik DNA. Pembuatan fotomikroskopi dilakukan segera setelah pewarnaan, karena bahan *Sybr Green* hanya dapat bertahan selama dua kali 24 jam pada suhu 4°C. Hasil fotomikroskopi selanjutnya ditransfer ke personal komputer dengan bantuan *scanner*. Pada penghitungan tubulus dentin digunakan program *Image Tool* untuk menghitung persentase jumlah titik hitam dan putih. Selanjutnya dengan analisa regresi dihitung usia estimasi.

Metode USE adalah metode dekalsifikasi yang dikembangkan oleh Noto Soehardjo (2001), untuk dekalsifikasi tulang dan gigi. Teknik ini adalah teknik dekalsifikasi yang cepat, sederhana dan murah. Prinsip dasar metode ini adalah mempercepat proses dekalsifikasi dengan cara menaikkan temperatur dan perlakuan sonikasi pada sampel yang direndam dalam EDTA 0,5 M.

Program *Image Tool* adalah program untuk memproses dan menganalisa gambar. Program dari *Windows* ini mampu menerima, menggambarkan, mengedit, memproses, mengukur, menyimpan dan mencetak dalam bentuk hitam putih dan berwarna. Fungsi analisa program ini mampu mengukur dimensi (jarak, sudut, keliling, luas) dan pengukuran skala abu-abu (titik, garis, dan luas histogram) dengan statistik. *Image Tool* membantu fungsi proses penggambaran seperti manipulasi kontras, ketepatan, menyamakan, mendeteksi keliling, filter median dan sudut ruang .

DNA manusia terdiri dari dua utas polinukleotida (*double stranded*) dan terdapat di dalam inti sel (linier) maupun dalam mitokondria (sirkuler). Setiap nukleotida mengandung basa N, gugusan fosfat, dan fraksi gula (deoksiribosa untuk DNA dan ribosa untuk RNA). Basa N yang menyusun nukleotida terdiri dari 4 jenis : Adenin (A), Guanin (G), Sitosin (C) dan Timin (T). Nukleotida satu dengan lainnya dalam satu utas DNA dihubungkan oleh ikatan fosfodiester yang membentuk polimer berupa polinukleotida (asam nukleat). Setiap basa N pada satu utas memiliki ikatan hidrogen dengan basa yang komplementer pada utas yang lain. Basa komplementerr A-T (2 ikatan hidrogen) dan C-G (3 ikatan hidrogen) menyebabkan dua utas DNA tersebut membentuk konfigurasi *double heliks*.

Dalam satu sel haploid mengandung DNA dengan lebih kurang $3,5 \times 10^9$ nukleotida atau pasangan basa, yang terdapat dalam 23 kromosom. Bila seluruh DNA dalam satu sel tersebut direntangkan dapat mencapai panjang sekitar 1,5 meter. Deoksiribosa dari nukleotida yang berada di ujung utas DNA bila memiliki atom C ke-5 bebas (tidak membentuk ikatan fosfodiester) ujung utas DNA tersebut ditandai dengan 5'. Sedangkan pada ujung lainnya, atom C ke-3 dari deoksiribosa dalam keadaan bebas, sehingga ujung ini ditandai dengan 3'. Nukleotida yang berada di ujung 5' dari utas DNA yang satu, komplementer dengan nukleotida yang berada di ujung 3' dari utas DNA yang lain.

Polymerase Chain Reaction adalah teknik amplifikasi enzimatik yang mampu menggandakan segmen DNA menjadi jutaan kali dari segmen asal. Sejak amplifikasi DNA menggunakan *Polymerase Chain Reaction* dilaporkan pertama

kali pada tahun 1985, aplikasi dan modifikasi penggunaan *Polymerase Chain Reaction* terus berkembang, hingga ditemukan teknik penentuan jenis kelamin (Stacks dan Witte, 1996).

Manusia memiliki kromosom heteromorfik yang menentukan jenis kelamin saat perkembangan embrio. Pada wanita ditandai dengan kromosom XX, dan pada pria terdapat kromosom XY. Protein penting yang berperan dalam penentuan jenis kelamin melalui gigi adalah amelogenin. Yaitu salah satu protein matriks mayor yang disekresi oleh ameloblas dari enamel. Gen amelogenin mengkode protein yang terletak pada kromosom X dan Y pada manusia. (Sivagami et al, 2000). Gen amelogenin mampu memberikan informasi penentuan jenis kelamin dengan bantuan sampel biologi yang mengandung sedikit DNA atau DNA telah terdegradasi menggunakan teknik amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (Budowle et al, 1996).

Pembacaan hasil amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* menggunakan elektroforesis adalah teknik yang tepat untuk menentukan berat molekul dan memisahkan makromolekul. Prinsip dasar elektroforesis adalah bila DNA berada di kutub negatif, DNA bergerak dalam arus listrik menuju katoda kutub positif. Untuk itu dibutuhkan matriks seperti agarosa atau polyacrylamide yang berperan sebagai konduktor panas dan meningkatkan penapisan. Visualisasi hasil elektroforesis dapat diamati di atas sinar ultra violet dengan bantuan pengecatan. Keunggulan pengecatan yang dilakukan setelah *running* adalah mencegah kemungkinan kerusakan DNA dan kerusakan akibat migrasi. Hanaoka dan Minaguchi (1996) menemukan bahwa pengecatan menggunakan *silver staining*

lebih sensitif dibanding pengecatan menggunakan ethidium bromide. Notosoehardjo (2001) membuktikan dalam penelitiannya bahwa *silver staining* dapat diterapkan untuk pengecatan DNA pada gel agarosa, sehingga meningkatkan visualisasi penentuan jenis kelamin melalui analisa *Polymerase Chain Reaction*, yang lebih mudah dan relatif murah dibanding PCR kit komersial. Metode baru pengecatan perak pada gel agarosa ini akan memperjelas separasi dan sensitivitas sebesar 2,5 kali lebih sensitif dibanding pengecatan menggunakan ethidium bromide.

3.1.2 Penentuan Usia

Penentuan usia melalui gigi telah dilakukan Gustafson sejak tahun 1950. Selanjutnya metode Gustafson ini terus dikembangkan oleh beberapa peneliti diantaranya Lamendin (1992) dan Amariti et al (2000). Pemilihan spesimen gigi berdasarkan pertimbangan bahwa gigi adalah jaringan tubuh manusia yang paling tahan terhadap kerusakan (Griffiths, 1992).

Metode pemeriksaan penentuan usia ini menggunakan metode *Ratio of Schlerosis to Tubulus* yang dikembangkan oleh Amariti et al (2000). Pada penelitian ini dihitung jumlah tubulus yang mengalami sklerosis di mahkota gigi dengan program komputer. Penghitungan tubulus di mahkota berdasar pada pendapat Jansen et al (1996), bahwa proses sklerosis dentin berawal di bagian akar dan berakhir di bagian mahkota.

Pada tahap awal, elemen gigi direndam ethanol 75% dan dilakukan pemotongan mahkota gigi di daerah servikal dengan arah transversal

menggunakan *Carborundum Disc*. Potongan gigi selanjutnya didekalsifikasi dengan metode *USE* melalui perendaman menggunakan bahan *chelating* yaitu EDTA (*Ethylenediamine Tetracetic Acid*), pada suhu 56°C, dan dilakukan sonikasi selama 1 jam. Metode *USE* (Ultrasonikasi, Suhu, EDTA) adalah metode dekalsifikasi yang dikembangkan oleh Notosoehardjo (2001) untuk dekalsifikasi tulang dan gigi yang cepat, sederhana dan murah. Prinsip kerja dari metode ini adalah mempercepat kelarutan ion kalsium dengan cara menaikkan suhu dan penambahan ultrasonikasi. Fungsi EDTA untuk menangkap ion kalsium pada bagian enamel gigi, dan mengubah ion kalsium menjadi bentuk kristal yang mengecil secara progresif selama proses dekalsifikasi berlangsung. Untuk memonitor proses dekalsifikasi, digunakan larutan jenuh ammonium oksalat (Hochmeister, 1991). Apabila supernatan tetap jernih setelah ditetesi ammonium oksalat, proses dekalsifikasi dihentikan.

Dilanjutkan dengan pembuatan preparat histologi, menggunakan pewarnaan *Sybr Green*, yang akan digunakan untuk pembuatan fotomikroskopi. Bahan pewarnaan *Sybr Green* adalah bahan pewarnaan spesifik DNA. Pada tubulus dentin bahan ini berikatan dengan protein kolagen yang terdiri dari empat asam amino yaitu glisin, alanin, prolin, dan hidriksiprolin (Bertram et al, 1988). Dengan bahan pewarnaan ini, tubulus dentin tampak berwarna hijau, dan sklerosis dentin berwarna hitam.

Langkah selanjutnya dilakukan fotomikroskopi fluoresen. Pada hasil fotomikroskopi ini dilakukan *scanning*, dan diaplikasi ke program komputer *Image Tool* untuk penghitungan tubulus yang mengalami sklerosis. Penghitungan

tubulus diawali dengan merubah warna fluoresen menjadi warna hitam-putih (*grey scale*). Selanjutnya program komputer akan menghitung perbandingan warna hitam dan putih dalam persentase. Nilai persentase yang didapat selanjutnya dianalisa regresi untuk mendapatkan perkiraan usia dan memperoleh rumus penghitungan *Ratio of Sclerosis to Tubulus* pada mahkota, dan rata-rata perbedaan antara usia sebenarnya dan usia estimasi. Diharapkan metode ini dapat memperkecil bias penentuan usia.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan landasan teori yang ada dan sehubungan dengan permasalahan, maka dapat dirumuskan hipotesis sebagai berikut :

1. Isolasi DNA dari pulpa gigi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* menggunakan *primer Amelogenin* dapat mendeteksi jenis kelamin.
2. Penghitungan tubulus dentin di mahkota gigi menggunakan metode *Ratio of Sclerosis to Tubulus* dapat menentukan usia.

Penghitungan besar sampel penentuan usia ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$n = \frac{(Z_{\alpha})^2 \times (\sigma)^2}{d^2}$$

di mana :

$$\alpha = 0,05$$

$$Z = 1,96$$

$$d = 0,3 \text{ SD}$$

$$\sigma = \text{SD dari trial}$$

Dari hasil perhitungan dengan rumus tersebut diperoleh $n = 42$.

4.4.2 Kriteria Sampel

- Elemen gigi untuk isolasi DNA dan preparat histologi pada RST menggunakan gigi P1 yang apeksnya telah menutup, yang telah dicabut di Lab. Bedah Mulut FKG Universitas Airlangga.
- Diketahui jenis kelamin dan usia penderita yang giginya dicabut sebagai kontrol penentuan jenis kelamin dan usia.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Klasifikasi Variabel

A. Penentuan jenis kelamin

- Variabel bebas
 - Jaringan pulpa gigi
- Variabel tergantung
 - Jenis kelamin
- Variabel kendali :
 - Cara pengambilan jaringan pulpa
 - Berat jaringan pulpa
 - Cara isolasi jaringan pulpa
 - Pengukuran spektrofotometer
 - Optimasi *Polymerase Chain Reaction*
 - Primer Amelogenin
 - Cara *running electrophoresis*
 - Cara pengecatan *silver staining*

B. Penentuan usia

- Variabel bebas
 - Hasil penghitungan *Ratio of Sclerosis to Tubulus* pada mahkota gigi
- Variabel tergantung
 - Usia

- Variabel kendali :
 - Proses dekalsifikasi dengan metode *USE*
 - Cara pembuatan preparat histologi
 - Standar diafragma dan waktu *exposure* fotomikroskopi
 - Cara penghitungan program *Image Tool*

4.5.2 Definisi Operasional Variabel

- Penentuan jenis kelamin adalah identifikasi melalui isolasi DNA dari gigi, yang kadarnya diukur menggunakan Spectrophotometer, dilanjutkan dengan pemeriksaan PCR.
- *Polymerase Chain Reaction* adalah reaksi enzimatik untuk menggandakan produk primer hingga didapat DNA untai panjang.
- Hasil setelah elektroforesis berupa pita DNA. Pita 106 bp dan 112 bp dipakai sebagai kontrol yang akan menunjukkan kromosom X dan Y dari gen amelogenin.
- Penentuan usia adalah identifikasi menggunakan metode *Ratio of Sclerosis to Tubulus* (RST) pada tubulus dentin gigi di bagian mahkota.
- *Ratio of Sclerosis to Tubulus* ditentukan melalui pembuatan preparat histologi dengan dekalsifikasi teknik *USE*, pengecatan *Sybr Green*, dibuat fotomikroskopi fluoresen, dilakukan *scanning* untuk penghitungan dengan program *Image Tool*.
- Hasil penghitungan perbandingan antara tubulus dentin dan sklerosis menggambarkan usia penderita.

4.6 Lokasi Penelitian

Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga.

4.7 Bahan Penelitian

A. Penentuan jenis kelamin

- Elemen gigi
- EDTA 0,5 M (Merck, Art 8418)
- *Deionized Water* (Otsuka)
- *Chelex 10%* (Sigma, S 5641)
- *PCR Master Mix* (Promega)
 - dNTPs
 - Buffer PCR
 - Mg Cl₂
 - *Taq Polymerase*
- *Primer Amelogenin* : (Genset Singapore Biotechnology Pte Ltd)
 - Genset I. 5'-ACCTCATCCTGGGCACCCTGG-3'
 - Genset II. 5'-AGGCTTGAGGCCAACCATCAG-3'
- Polyacrylamide Agarose Gel :
 - Acrylamide
 - Tris-borate EDTA (TBE)
 - Agarose Gel
 - TEMED (Tetramethylethylenediamine)
 - APS (Amonium persulfate)

- *Loading dye* :
 - 0,25% Bromo phenol blue
 - 0,25% xylene cyanol FF
 - 30% glycerol
- *Silver staining* :
 - 0,1% Ag NO₃
 - 2% Glycerol
 - *Deionized water*
 - 20% metanol
 - 10% ethanol
 - 5% glacial acetic acid
 - 1,5% NaOH
 - 0,1% formaldehyde
 - 10% acetic acid

B. Penentuan usia

- Elemen gigi
- EDTA 0,5 M (Merck, Art 8418)
- Parafin
- Albumin
- Gelas obyek dan penutup
- Pengecatan *SYBR GREEN* (Bio Whittaker Molecular Application, Rockland USA)
- Film fotomikroskopi (Fuji film ASA 200)

4.8 Alat

A. Penentuan jenis kelamin

- Reamer dan jarum ekstirpasi
- Vortex (Wirli Mixer, Nickel Electro Ltd, England)
- Water Bath
- Spektrofotometer (UV visible 1601, Shimaszu, Japan)
- Pipet (Eppendorf)
- Tube Polypropilene
- PCR Machine (Gene Amp PCR System 9700, USA)
- Gel casting tray dan gel comb
- Electrophoresis tank
- Centrifuge (Himac SCR 20 B, Hitachi, Japan)

B. Penentuan usia

- Tabung reaksi
- Sonikator (Elma D 78224 Singen Htw, Germany)
- Cetakan blok parafin
- Mikrotom
- Fotomikroskop (Nikon Aptihot-2, Japan)
- Program *Image Tool* (Windows)
- Komputer personal

4.9 Cara Penelitian

4.9.1 Penentuan Jenis Kelamin

4.9.1.1 Isolasi DNA

1. Dibuat *orifice* pada oklusal elemen gigi menggunakan *round end low speed bur* hingga ruang pulpa terbuka.
2. Selanjutnya dilakukan pengambilan jaringan pulpa dan dinding pulpa menggunakan jarum ekstirpasi dan reamer mulai ukuran sedang sampai besar yang steril, hingga didapat 1 gram jaringan pulpa, kemudian ditampung dalam tabung *eppendorf* steril.
3. Tambahkan EDTA 0,5 M sebanyak 1 ml.
4. Dilakukan sonikasi dengan alat ultrasonik 33.000 Hz, pada suhu 56°C, selama 1 jam.
5. Sentrifugasi 12000 rpm, selama 10 menit.
6. Buang supernatan.
7. *Pellet* pulpa dicuci dengan *deionized water* 1 ml.
8. Vortex, kemudian sentrifugasi 12000 rpm, selama 10 menit.
9. Buang supernatan.
10. *Pellet* pulpa ditambah 200 ml Chelex 10%, vortex kembali.
11. Inkubasi pada 56°C, selama 20 menit. Pada tahap ini perlu dilakukan vortex beberapa kali.
12. Dipanaskan pada suhu 100°C, selama 8 menit.
13. Sentrifugasi 12.000 rpm, selama 2 menit.
14. Setelah tahap ini, didapatkan supernatan yang mengandung DNA.

15. Dari isolasi DNA dapat dianalisa kemurnian dan jumlah DNA dengan menggunakan *UV Spectrophotometer* yang dibaca pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Kadar DNA yang dihasilkan diketahui dari hasil pembacaan absorpsi 260 x 280 x pengenceran x 50 ng/ul, didapatkan hasil konsentrasi DNA dalam nanogram/mikroliter.

(Notosoehardjo, 2001)

4.9.1.2 *Polymerase Chain Reaction*

1. Setelah diisolasi dan ditentukan kadar DNA, selanjutnya digandakan dengan metode PCR untuk dapat dianalisis jenis kelaminnya.
2. Pada *ependorf* berisi 2 ul sampel DNA ditambahkan pasangan *primer Amelogenin*. Pasangan primer yang digunakan adalah Genset I. 5'-CTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3' dan Genset II. 5'-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3' masing-masing sebanyak 2 ul, PCR master mix 12,5 ul yang terdiri dari dNTPs, buffer PCR, MgCl₂ dan *taq polymerase*, dan *deionized water* hingga tercapai jumlah total 25 ul.
3. Reaksi amplifikasi segmen DNA dengan menaikkan suhu hingga 96°C selama 2 menit, dilanjutkan denaturasi pada suhu 95°C, selama 1 menit, *anealing* pada 64°C selama 1 menit, dan *extention* pada 70°C selama 1,5 menit. Reaksi ini diulang sampai 10 kali.

4. Dilakukan pengulangan sebanyak 20 kali terdiri dari denaturasi selama 1 menit pada 90°C, *annealing* pada 64°C selama 1 menit, dan *extention* pada 70°C selama 1,5 menit.
5. Suhu dipertahankan pada 4°C.

4.9.1.3 *Electrophoresis*

1. Sesudah amplifikasi PCR, 5 ul produk PCR ditambah 1 ul *loading dye* dan 100 bp DNA *ladder* dijalankan pada agarose setebal 2 mm. Fungsi *loading dye* sebagai pemberat DNA agar dapat diikat oleh agarose dan monitor jalannya *electrophoresis*.
2. Larutan disepariasi secara *horizontal discontinue type electrophoresis*.
3. Hasil elektroforesis ditampilkan dengan menggunakan polyacrylamide agarose gel dengan pengecatan *silver staining*.

4.9.1.4 Pengecatan *Silver Staining*

1. Setelah elektroforesis, gel direndam selama 10 menit dalam metanol 20% dan glyserol 2%.
2. Untuk fiksasi dilakukan perendaman gel selama 20 menit dalam larutan 10% ethanol dan 5% glacial acetic acid pada suhu kamar.
3. Setelah fiksasi gel direndam larutan AgNO₃ 0,1% selama 15 menit, kemudian dicuci cepat dengan *deionized water*. Langkah ini bertujuan untuk mengeliminasi perak yang berlebihan.

4. Larutan dikembangkan dalam larutan NaOH 1,5% dan formaldehyde 0,1%, sampai didapatkan gambaran pita dengan latar belakang berwarna kuning.
5. Pengecatan dihentikan dengan larutan methanol 20% dan asam asetat 10%.
6. Gel hasil pengecatan dengan AgNO₃ difoto dengan *back illumination* (White fluorescent lamp 6500K x 15 watt).
7. Dilakukan foto menggunakan kamera digital, hasil foto dipindahkan ke personal komputer menggunakan program *Adobe Photoshop*.

4.9.2 Penentuan Usia

4.9.2.1 Pembuatan Preparat Histologi

1. Elemen gigi direndam dalam larutan ethanol 75%, kemudian dilakukan pemotongan mahkota gigi dengan arah transversal menggunakan *Carborundum Disc* yang dipasang pada *bur low speed*.
2. Dilakukan dekalsifikasi menggunakan metode USE (Notosoehardjo, 2001). Metode ini dipilih karena sederhana, cepat dan murah. Potongan gigi ditempatkan dalam tabung polypropilene, ditambahkan larutan EDTA hingga seluruh potongan gigi terendam.
3. Tabung polypropilene dimasukkan dalam sonikator selama 1 jam, suhu dinaikkan menjadi 56°C.

4. Tes menggunakan ammonium oksalat jernih. Bila larutan sudah jernih, berarti dekalsifikasi telah sempurna. Bila tetap keruh, ulangi langkah sonikasi kembali.
5. Dekalsifikasi dihentikan dengan mencuci potongan gigi dengan aquades steril untuk menghilangkan ion-ion.
6. *Centrifuge* 12.000 rpm selama 10 menit.
7. Pellet siap untuk diproses histologi.
8. Dilakukan penanaman pellet dalam parafin, dipotong setebal 3 μm . Potongan diletakkan di atas gelas obyek dengan perekat albumin.
9. Dilakukan pengecatan menggunakan *Sybr Green* sebanyak 10 ml selama 10 menit.
10. Preparat segera diamati dan difoto menggunakan fotomikroskopi fluoresen.
11. Hasil fotomikroskopi dipindahkan ke personal komputer menggunakan scanner.

4.9.2.2 Penghitungan *Ratio of Sclerosis to Tubulus*

1. Hasil gambar fotomikroskopi diubah dalam bentuk *grey scale*.
2. Kontras antara hitam dan putih diperbesar, untuk memudahkan penghitungan ratio sclerosis tubulus. Besar satuan kontras ditetapkan sebesar 75 pada seluruh hasil gambar.
3. Selanjutnya masing-masing gambar dianalisa untuk menghitung luas daerah hitam dan putih.

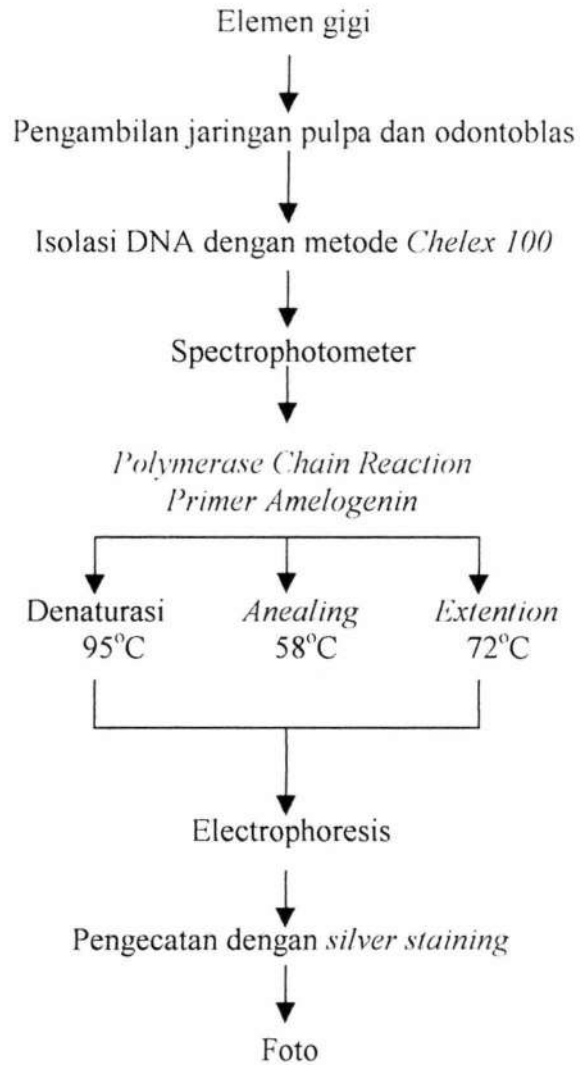
4. Program komputer selanjutnya menghitung persentase perbandingan daerah hitam dan putih.
5. Nilai yang didapat pada masing-masing gambar selanjutnya dicatat sebagai nilai *Ratio of Sclerosis to Tubulus*.

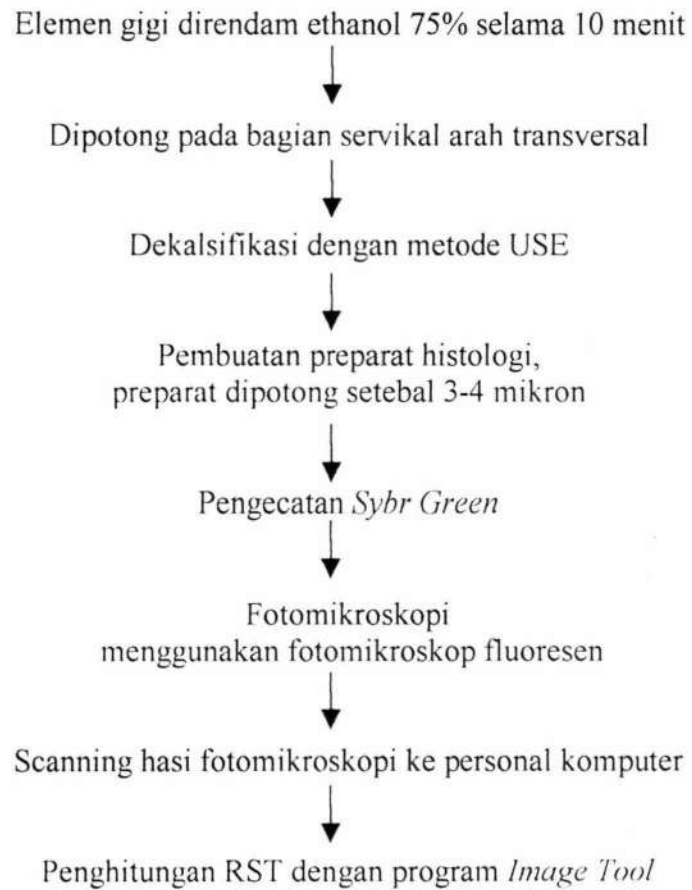
4.10 Analisa Data

Analisa data pada penentuan usia menggunakan uji regresi

4.11 Alur Penelitian

a. Penentuan Jenis Kelamin



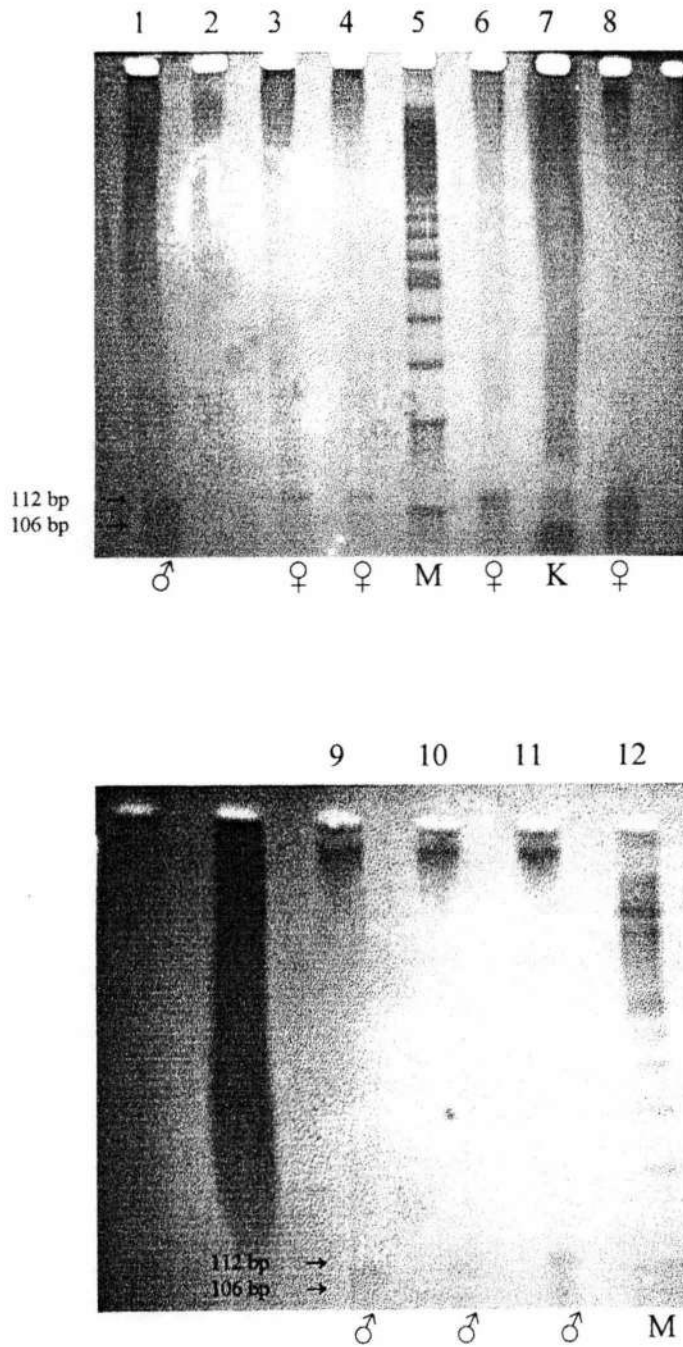
b. Penentuan Usia

kromosom X yang terletak pada 106 *basepair*, dan kromosom Y pada 112 *basepair*.

Bila individu berjenis kelaminis pria (XY) maka pada pemeriksaan terlihat gambaran 2 pita yaitu pita 106 *basepair* dan pita 112 *basepair*. Bila berjenis kelaminis wanita terlihat gambaran sebuah pita yaitu 106 *basepair*.

Beda 6 *basepair* antara *band* X spesifik dan Y spesifik terjadi sebagai akibat adanya delesi 6 *basepair* pada intron pertama X homolog gen amelogenin.

Pada gambar 5.1 tampak pada nomor 1, 9, 10, 11 pita terletak pada 106 *basepair* dan 112 *basepair* yang berarti sampel berjenis kelaminis pria. Nomor 5 dan 12 adalah marker. Pita nomor 3, 4, 6, 8 tampak pita terletak pada 106 *basepair* yang berarti sampel berjenis kelaminis wanita. Nomor 7 adalah kontrol pria.

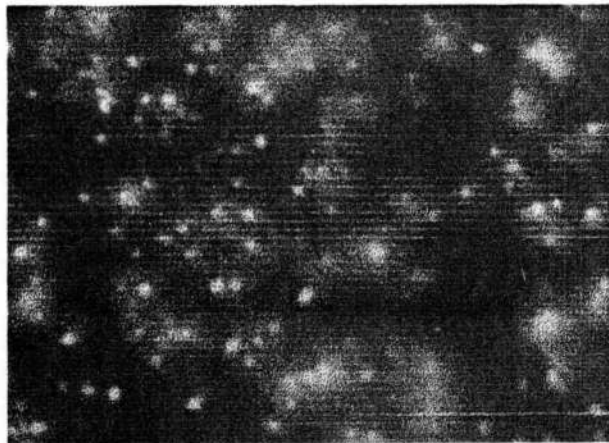


Gambar 5.1 Hasil *electrophoresis* penentuan jenis kelamin menggunakan *primer Amelogenin* dengan isolasi DNA dari pulpa gigi.

5.2 Penentuan Usia

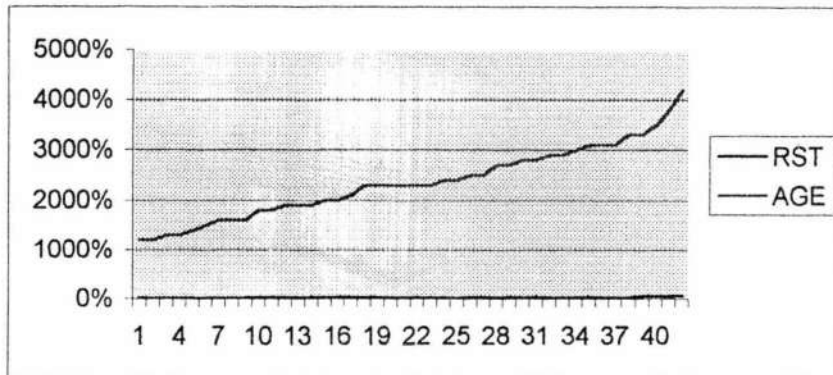
Dari hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan data yang disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.

Gambar 5.2 menunjukkan hasil foto mikroskopi preparat histologi yang dicat dengan *Sybr Green*. Gambaran hitam menunjukkan sklerosis dan gambaran hijau menunjukkan tubulus dentin. Selanjutnya program *Image Tool* merubah masing-masing hasil foto menjadi gambaran hitam-putih. Luas daerah hitam mewakili area sklerosis dan daerah putih mewakili tubulus dentin dihitung dalam bentuk persentase. Persentase hitam adalah luas area hitam dibanding luas seluruh lapang pandang. Persentase putih adalah luas area putih dibanding luas seluruh lapang pandang. *Ratio of Sclerosis to Tubulus* adalah nilai hasil perbandingan luas hitam dan luas putih dalam persentase. Usia adalah data usia sampel yang diambil dari data status penderita.



Gambar 5.2 Hasil foto mikroskopi preparat histologi tubulus dentin yang diwarnai dengan bahan cat *Sybr Green*.

Untuk memperjelas perbandingan nilai *Ratio of Sclerosis to Tubulus* dan usia, dapat dilihat pada *scatter diagram*. *Scatter diagram* disajikan pada Gambar 5.3 memperlihatkan distribusi antara nilai *Ratio of Sclerosis to Tubulus* dan usia.



Gambar 5.3 Distribusi usia terhadap *Ratio of Sclerosis to Tubulus*.

Dari diagram di atas tampak bahwa perbandingan angka persentase area hitam dan putih yang menentukan nilai *Ratio of Sclerosis to Tubulus*, meningkat setara dengan usia. Berdasar uji Regresi, didapatkan nilai $R^2 = 0,828$. Hal ini dapat diartikan ketepatan estimasi data dengan kondisi sebenarnya sebesar 82,8%, artinya 17,2% ketepatan estimasi dipengaruhi oleh faktor lain.

Tabel 5.2 Hasil uji regresi antara *Ratio of Sclerosis to Tubulus* dan usia.

Model	Jumlah Kuadrat	Db	Rerata Kuadrat	F	p
Regresi	1490,968	1	1490,968	87,008	0,001
Sisa	685,437	40	17,136		
Total	2176,405	41			

Model	B	SE	Beta	t	p
Konstanta	11,622	1,429		8,131	0,001
RST	0,419	0,045	0,828	9,328	0,001

Keterangan : Db = derajat bebas
 F = f hitung
 p = probabilitas
 B = harga slope/kemiringan garis regresi
 SE = Standart Error
 t = t hitung

Berdasarkan uji Regresi, didapatkan p anova = 0,001 < 0,05, hal ini menunjukkan bahwa data telah sesuai (*fit*) dengan garis Regresi.

Pada Tabel 5.2 didapatkan koefisien B konstanta = 11,622 dan koefisien B *Ratio of Sclerosis to Tubulus* = 0,419, sehingga didapat rumus penentuan usia berdasar *Ratio of Sclerosis to Tubulus* pada mahkota gigi adalah sebagai berikut :

$$\text{Usia estimasi} = 11,622 + 0,419 \text{ RST}$$

Penentuan usia berdasar koefisien di atas menghasilkan angka usia estimasi dengan selisih antara usia sebenarnya dan usia estimasi yang dapat dilihat pada analisa deskriptif pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Analisa Deskriptif Selisih antara usia sebenarnya dan usia estimasi.

	N	Minimum	Maksimum	Rerata	SD
Selisih	42	0,16	11,00	3,2047	2,48913

Dari Tabel 5.3 diketahui selisih antara usia sebenarnya berdasar status sampel dan usia estimasi adalah 3,2 tahun. Hasil pengukuran *Ratio of Sclerosis to Tubulus* pada mahkota gigi ini lebih baik daripada hasil *Ratio of Sclerosis to Tubulus* pada akar gigi yang dilakukan oleh Amariti et al (2000).

electrophoresis untuk membedakan letak *band* X dan Y karena hanya berbeda 6 *basepair*. Pada langkah *Electrophoresis*, peneliti menambahkan sampel kontrol yang telah diketahui berjenis kelamin pria dan wanita, untuk memudahkan pengamatan. Penambahan *Loading Dye* bertujuan sebagai pemberat DNA, karena DNA bersifat larut dalam air. Pada penelitian ini, seluruh sampel menunjukkan *band* yang sesuai dengan data status sampel. Yang berarti penentuan jenis kelamin menggunakan metode PCR dapat mencapai kebenaran hingga 100%.

Penggunaan pengecatan *silver staining* dalam penelitian ini membuktikan bahwa *silver staining* dapat diterapkan untuk pengecatan DNA pada polyacrylamide agarosa gel, sehingga meningkatkan visualisasi penentuan jenis kelamin melalui *Polymerase Chain Reaction*. Pengembangan metode pengecatan *silver staining* yang mudah, murah, cepat dan lebih sensitif diharapkan dapat menggantikan pemakaian Ethidium Bromide yang karsinogen (Notosoehardjo, 2001; Hanaoka, 1996).

Penggunaan PCR lebih unggul dibanding penggunaan teknik lain, misalnya probe Y spesifik, karena selain lebih murah juga terdapat kontrol internal untuk meyakinkan hasilnya tidak negatif semu. Penelitian ini menunjukkan bahwa metode PCR dapat digunakan untuk analisa genetik, khususnya dalam penentuan jenis kelamin.

6.2 Penentuan Usia

Pada penelitian ini, peneliti menggunakan teknik dekalsifikasi *USE*, yaitu teknik dekalsifikasi tulang dan gigi yang dikembangkan oleh Notosoehardjo

(2001). Teknik ini terbukti sederhana, cepat dan biaya relatif kecil. Bahan utama yang digunakan adalah EDTA (*Ethylenediamine Tetracetic Acid*) 0,5 M dalam bentuk garam disodium. Meskipun bersifat asam, EDTA tidak bertindak sebagai suatu mineral atau asam organik tetapi menangkap ion metal, khususnya kalsium. Karena hanya mengikat ion kalsium, maka EDTA hanya bekerja pada lapisan luar tubulus dentin. Saat dinding tubulus menjadi tipis, kristal kalsium diubah menjadi ion-ion, sehingga bergerak progresif selama proses dekalsifikasi berlangsung. Teknik *USE* mempunyai keuntungan tidak mempengaruhi elemen jaringan lainnya. Bahkan protein tetap aktif setelah dekalsifikasi. Hal ini terbukti pada langkah pengecatan menggunakan *Sybr Green*. Bahan cat *Sybr Green* terbukti memberikan gambaran fluoresen pada fotomikroskopi. Dapat diartikan bahwa dalam tubulus dentin masih terdapat protein yang berikatan dengan bahan cat *Sybr Green*. Asam amino yang diperkirakan mengikat bahan cat *Sybr Green* adalah glisin, alanin, prolin atau hidroksiprolin.

Penelitian *Ratio of Sclerosis to Tubulus* yang dilakukan oleh Amariti (2000) menggunakan program komputer *Neural Network*. Pada penelitian ini, peneliti menggunakan program komputer *Image Tool (Windows)*. Program ini terbukti mampu mengukur luas area hitam yang berarti sklerosis dan putih yang berarti tubulus. Kedua luas area ini selanjutnya dihitung dalam satuan persentase, dan didapatkan nilai perbandingan luas area hitam dan putih yang selanjutnya disebut dengan nilai *Ratio of Sclerosis to Tubulus*. Dengan penelitian ini, ternyata perbedaan antara usia sebenarnya dan usia estimasi dapat diturunkan hingga 3,2 tahun. Perbedaan ini disebabkan oleh beberapa hal, diantaranya arah kurvatur

tubulus dentin yang mengikuti kecembungan mahkota gigi, menyebabkan kesulitan dalam arah pemotongan preparat agar tepat tegak lurus memotong tubulus dentin, atau pengambilan gambar fotomikroskopi yang kurang sempurna.

Calanois et al (1970) melaporkan peningkatan transparansi dentin berhubungan dengan peningkatan usia. Fenomena ini disebabkan deposisi garam kalsium di dalam dan di sekeliling tubulus dentin, yang menyebabkan terjadinya pembuntuan tubulus dentin, dan menyebabkan penurunan jumlah tubulus dan peningkatan sclerosis tubulus dentin. Dalam hal ini, tubulus yang termineralisasi menunjukkan index refraksi yang sama dengan dentin dan dentin terlihat lebih transparan.

Proses penuaan juga berpengaruh pada tubulus dentin, yang berakibat penyempitan dan pembuntuan tubulus. Berdasar pada sifat fisik peritubulus dentin, pembuntuan tubulus pada beberapa bagian gigi merubah sifat permeabilitas dentin menjadi transparan, yang tampak pada sediaan gosok gigi. Hal ini disebut dengan dentin sklerosis, yang sering tampak pada sepertiga apikal akar dan dibawah *cusp tip*. Pembentukan sklerosis merupakan bentuk perlindungan dentin terhadap pulpa.

Sklerosis dentin merupakan mekanisme proteksi enamel dan dentin terhadap atrisi dan trauma, karena prosesus odontoblas pada tubulus dentin berkurang di sebagian besar puncak *cusp* dan akar. Hal ini menyebabkan tubulus mengecil atau terisi mineral (Avery, 1988).

Deposisi garam kalsium di sekitar prosesus odontoblas adalah salah satu penyebab pembuntuan tubulus dentin. Pada penelitian menggunakan sinar

roentgen dan uji permeabilitas, tampak bahwa dentin yang mengalami sklerosis menjadi lebih terang. Uji kekerasan membuktikan bagian dentin ini menjadi lebih keras dibanding dentin normal.

Sebagai jaringan hidup, dentin yang terbuka, terpapar panas atau obat-obatan, akan menampakkan reaksi kerusakan pada odontoblas. Dentin yang terbuka harus dihindarkan dari obat, trauma, perubahan panas, atau iritasi bahan tumpatan. Karena tiap satu milimeter dentin yang terpapar, akan menyebabkan kerusakan 30.000 tubulus dentin.

memotong tegak lurus tubulus semaksimal mungkin, agar dapat dilakukan penghitungan *Ratio of Sclerosis to Tubulus* yang mendekati usia sebenarnya.

- Griffths CJ, 1992. *Forensic Odontology*. Temu Ilmiah Forensic Dentistry & Radiation Oncology, pp. 7-10.
- Hanaoka Y, and Minaguchi K, 1996. Sex determination from blood and teeth by PCR amplification of the Alplloid Satelit family. *Journal Forensic Science*, vol 41 (5), pp. 855-858.
- Harris EF and McKee JH, 1990. Tooth Mineralization Standart for Blacks and Whites from the Middle Southern United States. *Journal Forensic Science*, vol 35(4), pp. 859-872.
- Heras Martin-de las, Valenzuela A, Villanueva E, Marques T, Exposito N, Bohoyo JM, 1999. *Journal Forensic Science*, vol 44, pp. 428-431.
- Hochmeister MN, 1991. From Compact Bone From Human Remain. *Journal of Forensik Science*, 36, pp. 1649-1661.
- Jansen VR, 1996. *Oral Biology*. Quissance Publishing Co. Chicago, Berlin, London, Tokyo, Sao Paolo, pp. 227-308.
- Kolltveit KM, Solheim T, Kvaal SI, 1998. Methods of Measuring Morphological Parameters in Dental Radiographs Comparison Between Image Analysis and Manual Measurements. *Journal Forensic Science International*, pp.87-95.
- Kraus, Ronald E. Jordan, Leonard Abrams, 1988. *The Anatomy and Occlusion*. BC Decker Inc, Toronto, Philadelphia.
- Komura T, Nakamura H, Tsutsumi H, Morita Y, 2000. *Sex Determination from dental pulp using capillary gel electrophoresis of Amelogenin locus*. Department of Legal Medicine, Nihon University of Dentistry, Japan.
- Lamendin H, Baccino E, Hubert JF, Tavernier JC, Nossintchouk RM, Zerilli A, 1992. A simple technique for age estimation in adult corpses : the two criteria dental method. *Journal Forensic Science*, vol 38, pp. 763-764.
- Lund H and Mornstad H, 1999. *Gender determination by odontometrics in a Swedish population*. *Journal of Forensic Odonto-Stomatology*, Vol 17, no. 2, pp. 30-34.
- Mertaniasih, Ni Made, 2000. *Deteksi mutasi regio gen rpo B Micobacterium tuberculosis chain reaction single strand conformation*. Disertasi, Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Mieke Sylvia M, 1996. *Analisis genetik melalui pemeriksaan gigi*. Ceramah Singkat Forum Ilmiah Trisakti II, pp. 929-935.

- Mjor, IA, 1996. Textbook of Geriatric Dentistry. 2nd edition.
- Muller M, Bertrand MF, Quatrehomme G, Bolla M, Rocca JP, 1988. Macroscopic and microscopic aspect of incinerated teeth. *Journal Forensic Odontostomatology*, pp. 161-167.
- Murakami H, Yamamoto Y, Yoshitome K, Ono T, Okamoto O, Shigeta Y, Doi Y, Miyaishi S, Ishizu I, 2000. Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples. *Journal Acta Med Okayama*, vol 54, pp. 21-32.
- Notosoehardjo I, 2000. *Isolasi tulang dan gigi*. Lokakarya Metodologi Laboratorium Biologi Molekuler, pp. 2-6.
- Notosoehardjo I, 2001. *Penentuan Jenis Kelamin Melalui Analisa DNA*. Bagian Dari Penelitian untuk Disertasi, Pro Justisia Majalah Kedokteran Forensik Indonesia, vol 9 no. 1, pp. 13-15.
- Notosoehardjo I, Kuntaman, 2002. *Teori Dasar dan Penerapan Praktis PCR*. Tropical Disease Center Universitas Airlangga, pp. 1-11.
- Orban BJ, 1987. *Oral Histology and Embryology*. The C.V Mosby Company.
- Prihatini, 2000. *Penilaian kegunaan PCR dalam diagnostik*. Disertasi, Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Prince DA and Ubelaker DH, 2002. Application of Lamendin's adult dental aging technique to a diverse skeletal sample. *Journal of Forensic Science*, vol 47, pp. 107-116.
- Robert K. Murray, 1990. *Harper's Biochemistry*. 21sted, Prentice-Hall International Inc.
- Solheim T, 1992. A New Method For Dental Age Estimation In Adults. *Journal Forensic Science International*, vol 59, pp. 137-1.
- Smith, Fisher BC, Weeden VW, Warnock GR, Holland MM, 1993. A systematic approach to the sampling of dental DNA. *Journal of Forensic Sciences*, Vol 38 no.5, pp. 1194-1209.
- Stacks B, and Witte MM, 1996. Sex determination of dried blood stains using the Polymerase Chain Reaction (PCR) with homologous X-Y primers of the zinc Finger Protein Gene. *Journal of forensic science*, vol 41 no. 2, pp. 287-290.
- Swift EJ, Perdigao J, Heyman HO, 1995. Bonding to enamel and dentin : A brief history and state of art.

- Sivagami AV, Rajeswara Rao A, Varsney U, 2000. A Simple dan cost-effective method for preparing DNA from the hard tissue, and its use in Polymerase Chain Reaction amplification of amelogenin gen segment for sex determination in an Indian population. *Journal Forensic Science International*, 1100, pp. 107-115.
- Sweet D, 2001. Why a dentist for identification?. *Journal Dental Clinical North America*, Apr; 45(2), pp. 237-51.
- Stimson, PG and Mertz CA, 1997. *Forensic Dentistry*. CRC Press LLC, Florida.
- Sweet DJ, Sweet CH, 1995. DNA analysis of dental pulp to link incinerated remains of homicide victim to crime scene. *Journal Forensic Science*, vol 40, pp. 310-314.
- Urbani C, Lastrucci RD, Kramer B, 1999. The effect of temperature on sex determination using DNA-PCR analysis of dental pulp. *The Journal of Forensic Odonto-Stomatology*, vol 17 no. 2, pp. 35-39.
- Weber DF, 1974. Human Dentin Sclerosis: a microradiographic survey. *Journal Arch Oral Biology*, vol 19, pp. 163-9.
- Westwood Sara A & Werret David J, 1990. An evaluation of the Polymerase Chain Reaction method for forensic application. *Journal Elsevier Science International*, 45, pp.201-215
- Yamamoto K, 1996. Molecular biological studies on teeth, and inquests. *Journal Forensic Science International*, 80, pp. 79-87.

LAMPIRAN 1

Nomor Sampel	Jenis Kelamin (status)	Kadar DNA (ng/ul)	Kemurnian DNA	Jenis kelamin (Amelogenin)
1	p	312	1,07	p
2	w	232	1,04	w
3	w	768	1,26	w
4	w	120	1,04	w
5	w	904	1,17	w
6	p	208	1,10	p
7	p	160	1,09	p
8	w	56	1,01	w

LAMPIRAN 2

Tabel Hasil Penghitungan Menggunakan Program Image Tool

BLACK COUNT	WHITE COUNT	BLACK %	WHITE %	RST	AGE
192036	29211	86.8	13.2	15%	12
194665	20385	90.52	9.48	10%	12
200053	20594	90.67	9.33	10%	13
200009	23101	89.65	10.35	12%	13
184257	32993	84.81	15.19	18%	14
191054	28244	87.12	12.88	15%	15
187350	26438	87.63	12.37	14%	16
197193	23895	89.19	10.81	12%	16
183506	31544	85.33	14.67	17%	16
175544	45103	79.56	20.44	26%	18
173379	36446	82.63	17.37	21%	18
170213	44837	79.15	20.85	26%	19
186108	32880	84.99	15.01	18%	19
173983	49127	77.98	22.02	28%	19
183464	39798	82.17	17.83	22%	20
166345	52643	75.96	24.04	32%	20
172295	48793	77.93	22.07	28%	21
157217	48793	76.32	23.68	31%	23
164142	48252	77.28	22.72	29%	23
167198	38812	81.16	18.84	23%	23
182081	30313	85.73	14.27	17%	23
156063	53762	74.38	25.62	34%	23
169595	44355	79.27	20.73	26%	23
169351	50391	77.07	22.93	30%	24
194204	25538	88.38	11.62	13%	24
166121	54577	75.27	24.73	33%	25
164516	58746	73.69	26.31	36%	25
169293	50005	77.2	22.8	30%	27
155672	61496	71.68	28.32	40%	27
176666	39091	81.88	18.12	22%	28
143892	62118	69.85	30.15	43%	28
161517	55733	74.35	25.65	34%	29
172312	44938	79.32	20.68	26%	29
170790	46378	78.64	21.36	27%	30
146403	65991	68.93	31.07	45%	31
166877	52819	75.96	24.04	32%	31
183503	36193	83.53	16.47	20%	31
163358	52399	75.71	24.29	32%	33
139197	74753	65.06	34.94	54%	33
137653	79515	63.39	36.61	58%	35

138316	81426	62.94	37.06	59%	38
120420	93756	56.22	43.78	78%	42

Black count : Luas area sklerosis

White count : Luas area tubulus

Black % : Persentase daerah hitam

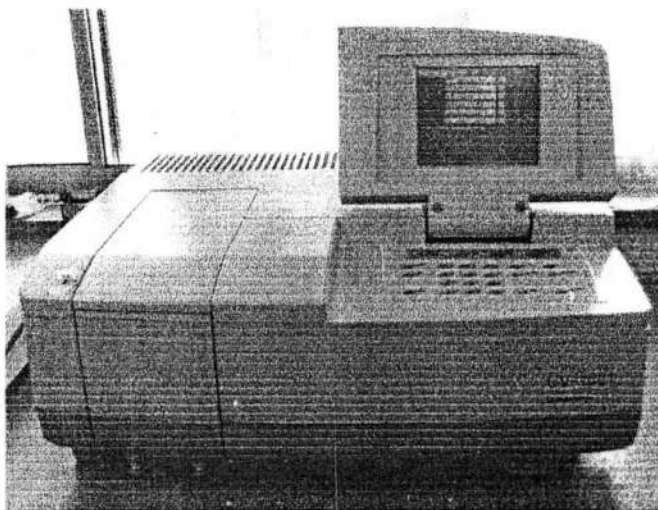
White % : Persentase daerah putih

RST : Hasil perbandingan persentase hitam dan persentase putih

Age : Usia dari status penderita

LAMPIRAN 3

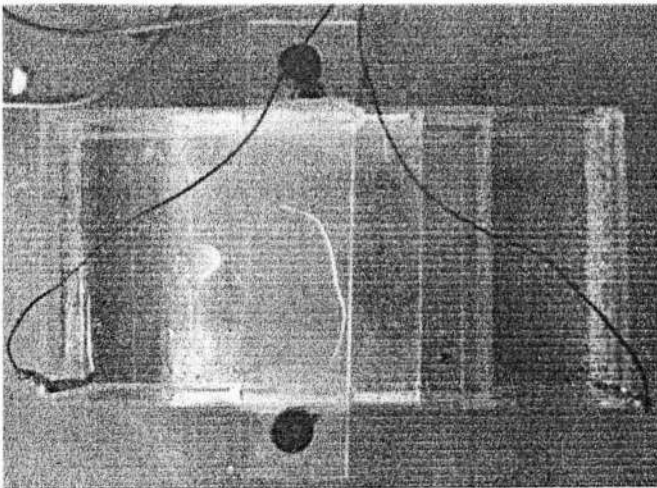
PCR Machine (Gene Amp PCR System 9700, USA)



Alat Spektrofotometer (UV visible 1601, Shimadzu, Japan)



Centrifuge (Himac SCR 20 B, Hitachi, Japan)



Elektroforesis

LAMPIRAN 4

	rst	umur	usia	selisih	sis
1	15.00	12.00	17.91	5.91	5.91
2	10.00	12.00	15.81	3.81	3.81
3	10.00	13.00	15.81	2.81	2.81
4	12.00	13.00	16.65	3.65	3.65
5	18.00	14.00	19.16	5.16	5.16
6	15.00	15.00	17.91	2.91	2.91
7	14.00	16.00	17.49	1.49	1.49
8	12.00	16.00	16.65	.65	.65
9	17.00	16.00	18.74	2.74	2.75
10	26.00	18.00	22.52	4.52	4.52
11	21.00	18.00	20.42	2.42	2.42
12	26.00	19.00	22.52	3.52	3.52
13	18.00	19.00	19.16	.16	.16
14	28.00	19.00	23.35	4.35	4.35
15	22.00	20.00	20.84	.84	.84
16	32.00	20.00	25.03	5.03	5.03
17	28.00	21.00	23.35	2.35	2.35
18	31.00	23.00	24.61	1.61	1.61
19	29.00	23.00	23.77	.77	.77
20	23.00	23.00	21.26	-1.74	1.74
21	17.00	23.00	18.74	-4.26	4.26
22	34.00	23.00	25.87	2.87	2.87
23	26.00	23.00	22.52	-.48	.48
24	30.00	24.00	24.19	.19	.19
25	13.00	24.00	17.07	-6.93	6.93
26	33.00	25.00	25.45	.45	.45
27	36.00	25.00	26.71	1.71	1.71
28	30.00	27.00	24.19	-2.81	2.81
29	40.00	27.00	28.38	1.38	1.38
30	22.00	28.00	20.84	-7.16	7.16
31	43.00	28.00	29.64	1.64	1.64
32	34.00	29.00	25.87	-3.13	3.13
33	26.00	29.00	22.52	-6.48	6.48
34	27.00	30.00	22.94	-7.07	7.07
35	45.00	31.00	30.48	-.52	.52
36	32.00	31.00	25.03	-5.97	5.97
37	20.00	31.00	20.00	-11.00	11.00
38	32.00	33.00	25.03	-7.97	7.97
39	54.00	33.00	34.25	1.25	1.25
40	58.00	35.00	35.92	.92	.92
41	59.00	38.00	36.34	-1.66	1.66
42	78.00	42.00	44.30	2.30	2.30

LAMPIRAN 5

Regression

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Ratio Sclerosis Tubulus		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Usia kronologis

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.828 ^a	.685	.677	4.13956

a. Predictors: (Constant), Ratio Sclerosis Tubulus

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1490.968	1	1490.968	87.008	.000 ^a
	Residual	685.437	40	17.136		
	Total	2176.405	41			

a. Predictors: (Constant), Ratio Sclerosis Tubulus

b. Dependent Variable: Usia kronologis

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	11.622	1.429		8.131	.000
	Ratio Sclerosis Tubulus	.419	.045	.828	9.328	.000

a. Dependent Variable: Usia kronologis

Correlations

Correlations

		Ratio Sclerosis Tubulus	Usia kronologis
Ratio Sclerosis Tubulus	Pearson Correlation	1	.828**
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	42	42
Usia kronologis	Pearson Correlation	.828**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	42	42

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Selisih	42	.16	11.00	3.2047	2.48913
Valid N (listwise)	42				

Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Ratio Sclerosis Tubulus	42	10.00	78.00	28.4762	14.39891
Valid N (listwise)	42				