

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penentuan Jenis Kelamin secara Biologi Molekuler

Penentuan jenis kelamin dan identifikasi seseorang dari bahan bukti biologis sangat esensial dalam bidang forensik. Petanda genetik dapat digunakan untuk memecahkan berbagai masalah identifikasi individual dimulai pada tahun 1920, ketika Max Richter dan Karl Landsteiner, penemu sistem golongan darah ABO, menyarankan bahwa golongan darah ABO dari bercak darah dapat membantu mengidentifikasi atau meniadakan para tersangka kriminal. Kemudian ketika dasar genetik golongan darah sistem ABO telah ditetapkan, konsep identifikasi biologis ini diperluas untuk penentuan hubungan darah terutama pada kasus paternitas. Sejak itu, banyak petanda genetik manusia lain yang berdasarkan pada serologi dan variasi elektromorf protein telah dikembangkan dan diterapkan dalam analisis forensik.

Kemajuan dalam identifikasi jenis kelamin dari bahan biologis forensik seperti bercak darah kering, tulang, rambut dimulai sejak Barr and Bertram (1949) menemukan dimorfisme seksual pada *mammalian interphase nuclei*. Davidson and Smith (1954) menemukan adanya dimorfisme seksual pada polymorphonuclear leucocytes dalam darah perifer manusia berdasar adanya drumstick pada perempuan. Dixon and Torr (1956) menggunakan sex chromatin dalam inti sel wanita. Matsumoto (1959, 1960) menemukan metode untuk identifikasi jenis kelamin suatu bercak darah kering dengan deteksi drumstick.

Akhir tahun 1971, ditemukan metoda deteksi Y chromatin dalam interphase nuclei dari pria dan tahun 1980 digunakan ratio hormon seksual, testosterone and progesterone, dengan radioimmunoassay (RIA). Semua ini memerlukan peralatan dan

reagen seperti antibodi dan bahan kimiawi yang mahal dan tidak dapat dilakukan apabila korban sudah membusuk.

DNA profiling dengan *Restriction Fragment Length Polymorphism* telah diakui sebagai suatu sarana yang canggih untuk membantu pihak penyidik dan penuntut umum dalam perkara tindak pidana kekerasan dan kejahatan seks. Selain itu juga terbukti mempunyai kegunaan yang sangat besar dalam identifikasi kerangka dan sisa tubuh korban pada kasus kriminal, perdata dan pelanggaran hak asasi.

Penentuan jenis kelamin merupakan langkah pertama yang harus dikerjakan untuk identifikasi seseorang. Apabila tulang tulang tersebut sudah hancur dan terpotong-potong maka pada keadaan ini satu satunya cara yang masih dapat dilakukan ialah melalui analisis DNA tulang yang diisolasi dari tulang tersebut.

2.1.1 Era biologi molekuler

Kemajuan dalam bidang serologi dibatasi oleh sejumlah faktor. Pertama, semua loci yang digunakan kecuali HLA menunjukkan variabilitas allelic yang sederhana yang membatasi kemampuannya dalam membedakan antara individu-individu. Kedua, kebanyakan petanda-petanda yang konvensional didasarkan pada golongan darah polimorfik dan enzim, oleh sebab itu tidak dapat digunakan untuk menganalisa bukti biologikal lainnya. Ketiga, petanda-petanda ini tidak stabil dan pada spesimen forensik sering kali mengalami kerusakan sampai batas dimana bukti biologikal ini secara serologi tidak dapat dianalisis.

2.1.2 Analisis DNA berdasarkan sistem DNA typing.

Secara retrospeksi, sangat mengejutkan bahwa pemikiran dari analisis forensik dengan analisis DNA oleh Jeffreys, Wilson dan Thein (1985) baru muncul 6 tahun setelah DNA polimorfisme manusia pertama kali diperinci. Keunggulannya dibanding

petanda konvensional ialah: DNA secara umum ditemukan dalam semua spesimen biologis, dalam keadaan tertentu, diketahui benar-benar stabil (dalam beberapa keadaan DNA dapat bertahan selama berjuta-juta tahun dalam bentuk yang dapat dianalisis (Kelman, 1996)), dan mengandung sejumlah tempat polimorfik yang hampir tak terbatas yang memungkinkan untuk identifikasi biologis yang khusus.

Minisatelit dan DNA fingerprinting

Sementara kebanyakan genom individu manusia tidak begitu bervariasi terdapat loci yang menunjukkan variasi tingkat tinggi. Yang paling terkemuka adalah loci minisatelit atau VNTR (variable number tandem repeat) yang terdiri dari pengulangan tandem dari rangkaian pendek, panjangnya 10-60 bp, dan sering menunjukkan variabilitas allelic yang ekstensif dalam pengulangan jumlah copy. Setelah penemuan Jeffreys di tahun 1984 yaitu motif rangkaian pendek yang dimiliki bersama oleh unit-unit pengulangan dari banyak minisatelit manusia, diketahui bahwa adalah mungkin untuk mendesain pelacak hibridisasi didasarkan pada motif ini yang dapat menghibridisasi secara serentak banyak minisatelit manusia untuk menghasilkan suatu profil (Southern blot) yang kompleks. Pola yang dihasilkan benar-benar bervariasi, bahkan di antara kerabat dekat (kecuali untuk kembar monozigot), sehingga layak dinamakan *DNA fingerprints* (Jeffreys, 1985).

Sistem ini semula dikembangkan untuk menyelidiki biologi minisatelit dan untuk memberikan petanda DNA yang lebih baik bagi genetika medis, tetapi begitu *DNA fingerprint* yang pertama dikembangkan bulan September 1984, terlihat implikasi forensiknya, baik untuk identifikasi dan untuk penentuan hubungan keluarga melalui sifat warisan yang sederhana dari *DNA fingerprints*. Pada permulaan tahun 1985, kasus perdata yang pertama kali, menyangkut kasus imigrasi, telah dipecahkan secara memuaskan dengan *DNA fingerprinting* (Jeffreys, 1985).

Di pertengahan tahun 1985, pembuktian DNA dalam kasus paternitas pertama telah diterima oleh pengadilan di Inggris, membuka jalan untuk aplikasi secara umum pada penentuan hubungan keluarga. Tuntutan pada tes tersebut berkembang dengan pesat, dan sebagai akibatnya, ICI mendirikan Cellmark Diagnostics untuk menyediakan pelayanan komersial *DNA typing*, mulanya di Inggris yang sekarang telah digunakan untuk memecahkan ribuan kasus.

Pelacak minisatelit locus tunggal

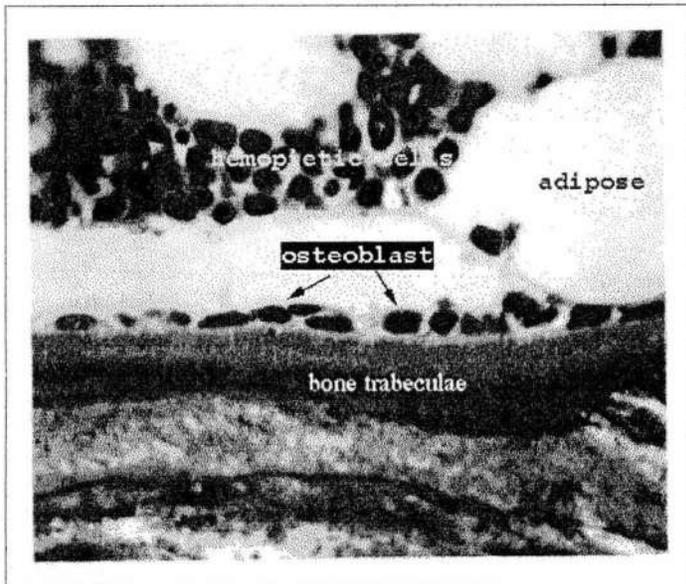
Pelacak *DNA fingerprint multi locus* untuk pertama kali menyajikan suatu metode untuk cloning sistematis dari banyak loci hiper variabel dari DNA manusia (Wong,1987). Minisatelit yang di cloning menyajikan petanda-petanda ultra informatif bagi hampir seluruh aspek analisis genetik manusia, seperti misalnya peta pertalian (*linkage mapping*).

2.1.3 DNA tulang

Jaringan memiliki kandungan DNA yang berbeda beda tergantung struktur serta komposisi selnya. Jaringan dengan banyak sel berinti dan sedikit jaringan ikat umumnya kadar DNANYA tinggi. Pemilihan organ mana yang akan diisolasi DNANYA guna analisis pada kasus forensik sangatlah penting (Atmadja, 1996). Pada keadaan yang sudah lanjut membusuk atau apabila hanya tinggal tulang belulang saja maka hanya tulang dan gigi saja yang masih dapat diperiksa.

Metode isolasi DNA pada bahan jaringan pada prinsipnya sama dengan metode isolasi sampel darah atau cairan tubuh lainnya, kecuali pada tahap awal jaringan tersebut harus dihancurkan lebih dahulu dan jaringan ikatnya dibuang. (Atmadja ,1996). Isolasi DNA jaringan organ tubuh seperti limpa, hati, ginjal , paru, otak tidaklah terlalu sulit karena tidak sekeras tulang yang sel selnya dikelilingi oleh suatu

matriks yang terdiri dari garam-garam anorganik *crystal hydroxyapatite* tersusun oleh kalsium dan fosfor. Untuk melakukan penelitian isolasi DNA tulang ada dua hal yang perlu dipelajari: yaitu karakteristik struktur tulang dan proses dekalsifikasi tulang



Gb. 2.1 Gambaran histologi tulang

2.1.4 Karakteristik tulang

Sel tulang berada dalam *lacunae*, yang dikelilingi oleh suatu matriks yang terinfiltrasi dengan garam anorganik, menyebabkan sifat tulang jadi *rigid* dan tidak fleksibel. Bagian luarnya merupakan jaringan fibrus disebut periosteum yang kaya pembuluh darah.

Struktur dasar tulang kompak

Suatu tulang kompak terutama terdiri dari substansi tulang, dengan ruangan-ruangan yang kecil-kecil. Tulang umumnya bagian luarnya tulang kompak, sedangkan bagian dalam merupakan tulang spongiosa.

Setiap sel tulang yang matang, disebut *osteocyt*, dikelilingi oleh matriks dalam suatu ruangan yang disebut *lacuna*. *Osteocyte* berasal dari *osteoblast*, yang terutama bertanggung jawab untuk pembentukan dari matriks organik tulang. Meskipun tidak membentuk matriks baru, *osteocyte* bertanggung jawab untuk memeliharanya. Baik *osteoblast* dan *osteocyt* adalah *post-mitotic*. Jumlah *osteocyt* menurut penelitian Frost (1960) 20.000 - 26.000 per mm³

Matriks tulang terdiri dari bahan organik - osteoid yaitu: Type I collagen 95%, GAGs (*chondroitin 4-sulfate*, *chondroitin 6-sulfate*, *keratin sulfate*) dan Glycoprotein. Bahan anorganiknya terdiri dari kristal *hydroxyapatite* dari calcium dan fosfor, carbonate, magnesium, fluoride, sulfate. Komponen anorganik merupakan 50 % dari berat tulang.

2.1.5 Dekalsifikasi tulang

Ada beberapa cara dan bahan untuk dekalsifikasi tulang antara lain: Bahan Chelating, yang paling umum digunakan untuk dekalsifikasi ialah EDTA (ethylenediamine tetracetic acid) dalam bentuk garam disodiumnya. Meskipun sifatnya *acid* dia tidak bertindak sebagai suatu mineral atau asam organik tetapi menangkap ion metalik, khususnya calcium. Karena hanya dapat mengikat ion kalsium maka hanya dapat bekerja pada lapisan luar bagian tulang (kristal apatite). Begitu lapisan ini menjadi tipis bentuknya diubah dari dalam oleh ion-ion, sehingga kristal ini menjadi kecil secara progresif selama proses dekalsifikasi berlangsung.. Proses ini lambat namun mempunyai keuntungan tidak mempengaruhi elemen jaringan lainnya, bahkan enzim masih tetap aktif setelah dekalsifikasi. Larutan yang digunakan umumnya berupa satu larutan sederhana dari kira kira 14 % (*approaching saturation*), *neutralised* atau dengan penambahan formalin. Waktu yang dibutuhkan untuk dekalsifikasi lengkap tulang padat dengan proses konvensional ialah 6-8 minggu,

namun makin kecil potongan tulang makin cepat prosesnya sehingga dapat kurang dari satu minggu.

Beberapa larutan yang sering digunakan: Hillmann dan Lee (1953) menganjurkan pemakaian larutan EDTA garam disodium 5.5 g + aquadest 90 cc dan Formalin 10 cc. Neutral EDTA : *EDTA disodium salt* 250 g + aquadest 1750 cc; Larutan ini sering keruh, dinetralisasi sampai pH 7 dengan penambahan kira-kira 25 g sodium hydroxide.

Faktor yang mempengaruhi kecepatan dekalsifikasi:

Ada beberapa faktor yang berpengaruh pada kerja larutan dekalsifikasi :

Konsentrasi reagen

Suhu

Agitasi

Suspension

Ion exchange resins

Electrolysis

Ultrasonics

Begitu dekalsifikasi lengkap, tulang harus dikeluarkan dari larutan tersebut. Hochmeister (1991) menganjurkan memonitor menggunakan larutan jenuh ammonium oxalat (modifikasi cara Clayden (1952)) pada pH 3.0 . Apabila supernatannya tetap jernih setelah ditetesi ammonium oxalat, proses dekalsifikasi dihentikan.

2.1.6 Isolasi DNA

Banyak penelitian dilakukan terhadap metoda ekstraksi DNA dan identifikasi jenis kelamin bahan biologis forensik seperti bercak darah, sperma, saliva jaringan otot, tetapi masih jarang dilakukan penelitian terhadap tulang korban yang sudah lama, membusuk, terendam air, atau pada korban yang hangus terbakar.

Metoda Isolasi DNA ada beberapa macam, umumnya melalui 3 tahap, yaitu menggunakan *lysis buffer*, *digestion buffer* dan *Proteinase K*. Perbedaan antara beberapa protokol yang ada biasanya hanya pada kompleksitas, jenis bahan kimia serta ada tidaknya modifikasi, penambahan dan pengurangan langkah-langkah prosedur konvensional (Atmadja DS, 1996) *Proteinase K*, enzim proteolitik yang relatif mahal, sulit didapat dan mudah rusak sudah jarang dan mulai ditinggalkan. Penelitian oleh Savitri (1995) membuktikan bahwa ekstraksi DNA darah menggunakan garam dapur tanpa enzim *Proteinase K* hasilnya tidak berbeda dengan yang menggunakan *Proteinase K*. Perkembangan terakhir, ekstraksi DNA dari darah menggunakan gel silica (reagen terdiri dari guanidine thiocyanate, EDTA, Tris-HCL, Triton X-100 dan DTT) memerlukan hanya 15 -20 menit dan menghasilkan DNA sebanyak 40 mikrogram per mililiter darah dengan DNA lebih dari 50 kb. (Maxim, 1995).

Beberapa kit sekarang sudah banyak beredar seperti DnaZol, Ready AMP. Namun isolasi DNA tulang/gigi dengan berbagai cara ini belum pernah dicoba disini. Osteosit dalam tulang adalah sekitar 20.000 -26.000 per milimeter kubik, sehingga dengan suatu prosedur ekstraksi yang efektif, sejumlah DNA yang potensial dapat di ekstraksi dari satu gram tulang. (Frost, 1960).

Dengan tehnik yang konvensional DNA dapat diekstraksi dari jenazah yang baru meninggal atau yang sudah membusuk, bahkan dari tulang yang telah berumur 11 tahun yang mengalami mumifikasi. Jumlah DNA yang dihasilkan berkisar dari 25 nanogram hingga 16 mikrogram tergantung seberapa jauh proses pembusukannya.

2.1.7 Amplifikasi DNA dan DNA typing.

Pengalaman selama ini menunjukkan bahwa sekitar 40% dari sampel-sampel forensik yang diajukan untuk DNA profiling menghasilkan DNA dalam jumlah dan kualitas yang tidak mencukupi (50 ng) untuk typing.

Polymerase Chain Reaction atau *PCR* adalah suatu metode *in vitro* untuk memperbanyak DNA secara enzimatik dengan menggunakan enzim DNA polimerase dan primer nukleotida yang melakukan hibridisasi bagian DNA dari dua arah yang berlawanan. Metode ini pertama kali dikembangkan oleh Kary Mullis kelompok Cetus pada tahun 1985 yang menggunakannya untuk memperbanyak DNA beta globin manusia untuk diagnosis prenatal kelainan genetik anemia sel sabit (*sickle cell anemia*). Mereka menemukan bahwa dengan mencampurkan DNA, enzim DNA polimerase, dua buah oligonukleotida (primer) dan bahan pembentuk DNA (dNTP) lalu menempatkan campuran tersebut berturut-turut pada 3 tempat yang bersuhu tertentu secara berulang-ulang, maka bagian DNA yang diapit oleh kedua primer akan memperbanyak diri sebanyak dua kali lipat siklus, maka DNA yang akan diperoleh banyaknya mencapai adalah 2 pangkat n kali lipat dari jumlah DNA semula.

Dalam bidang forensik, PCR sangat membantu dalam pemecahan berbagai masalah forensik, karena kemampuannya untuk menganalisis kasus dengan DNA tidak murni (tercampur), sedikit jumlahnya atau tidak segar lagi. Dengan metode ini berbagai pemeriksaan DNA, seperti analisis dotblot, analisis VNTR dan RFLP dapat

dilakukan secara lebih mudah dan cepat. Ditemukannya suatu mesin thermostat otomatis yang mengubah-ubah suhu menurut program yang ditentukan membuat proses amplifikasi DNA menjadi mudah, karena dapat berlangsung sendiri sesuai waktu yang dikehendaki. Hasil amplifikasi biasanya dinilai dengan melakukan elektroforesis pada gel agarosa dan pewarnaan *ethidium bromide*, yang di bawah sinar ultraviolet akan tampak sebagai sebuah pita DNA dengan panjang tertentu. Hasil amplifikasi dapat dianalisis dengan berbagai cara, diantaranya dengan metode *dot-blot* dan *reverse dot-blot* (lokus *HLA-DQA*), dipotong dengan enzim restriksi endonuklease tertentu, lalu dielektroforesis (*RFLP*), dilakukan *southern blotting*, *probing* dan elektroforesis (*VNTR*) atau langsung dianalisis pada gel poliakrilamid (*map-FLP*). Metode yang digunakan tergantung jenis polimorfisme DNA yang diperbanyak. Salah satu analisis DNA dengan metode PCR telah dikenal luas adalah analisis lokus *D1S58* (dahulu *D1S80*). Pemeriksaan lokus ini banyak disukai karena ukuran fragmennya yang kecil sehingga mudah diamplifikasi dan hasil resolusinya baik, sehingga memungkinkan untuk analisis sampel yang berdegradasi sebagian. Keuntungan lainnya adalah proses yang sederhana dan cepat memberikan hasil.

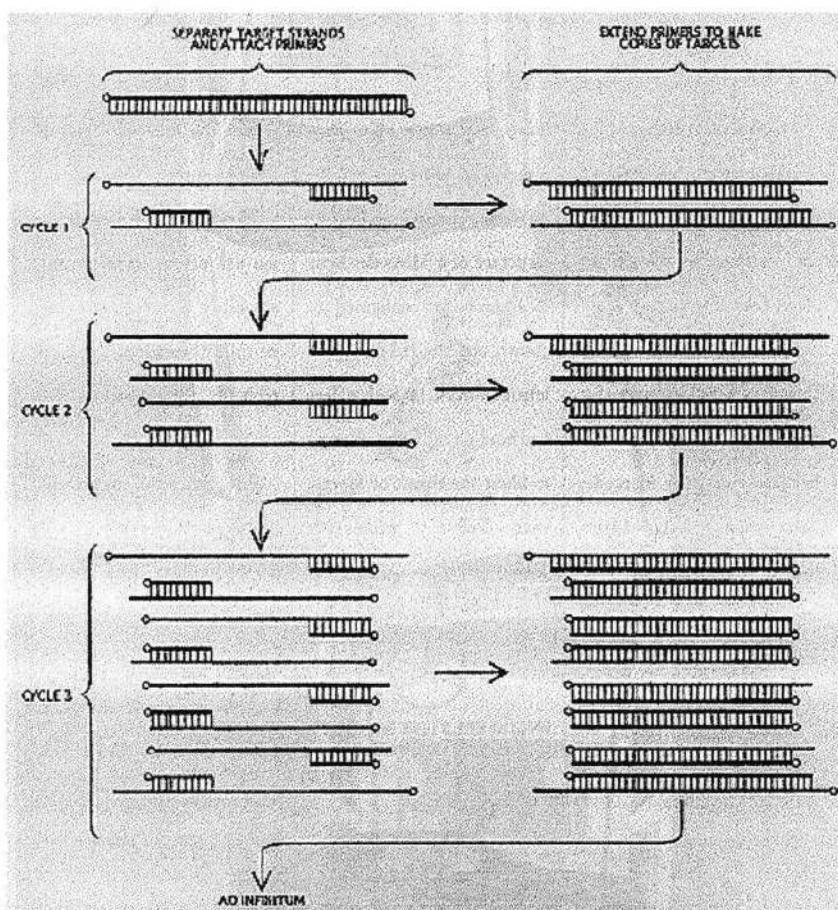
Metoda analisis PCR sangat disederhanakan di tahun 1988 dengan menggunakan *thermostable DNA polymerase*, memungkinkan DNA typing dalam prinsip diperluas ke tingkat sel tunggal, dan memungkinkan typing dari sampel yang sebelumnya membandel, seperti saliva dan jejas urine, rambut, gigi dan sisa-sisa kerangka. Metode PCR terbukti mempunyai kegunaan yang luas untuk forensik, karena kesederhanaan, sensitifitas dan realibilitasnya (Hochmeister, 1991; Ishizu, 1993) dan juga lebih unggul karena secara teoritis dapat mendeteksi jenis kelamin dari satu sel dan jauh lebih cepat hanya dalam waktu sekitar 5 jam, dibandingkan dengan menggunakan pelacak DNA

Beberapa sistem DNA typing yang berdasarkan PCR telah dikembangkan, seperti polymorphic HLA-DQa locus. Tahun 1989, Witt dan Erickson menemukan cara mendeteksi kromosom Y and X dengan sekwen DNA spesifik menggunakan polymerase chain reaction (PCR), dan sejak itu banyak penelitian dan pelacak digunakan untuk identifikasi jenis kelamin suatu bahan forensik (Pascal, 1991; Akane, 1992; Sasaki, 1995).

2.1.8 Prinsip kerja PCR

15-30 nukleotida yang disintesis secara kimia membentuk oligonukleotida primer (5'--3') pada kedua ujung segmen DNA yang akan diamplifikasi (DNA sasaran). Bila DNA (dari darah atau sampel jaringan) dipanaskan sehingga memisah (denaturasi) dan ditambahkan oligonukleotida primer (yang berlebih), kemudian didinginkan maka beberapa oligonukleotida primer akan hibridisasi dengan segmen pasangannya. Inkubasi dengan bahan-bahan baku (dNTP) dan enzim polimerase, maka terjadi reaksi pemanjangan (polimerisasi) oligonukleotida primer sesuai dengan cetakan DNA sasaran dengan kecepatan beberapa ratus basa per menit. Pemanasan kembali menyebabkan denaturasi, kedua utas DNA memisah, pendinginan kembali menyebabkan oligonukleotida primer (yang berlebih) akan hibridisasi dengan utas DNA sasaran dan dilanjutkan dengan polimerisasi. Bila ada oligonukleotida primer yang kedua, maka akan hibridisasi dengan utas pasangan DNA sasaran, dilanjutkan dengan reaksi polimerisasi. Pada pemanasan kembali, semua utas DNA yang memisah, tetapi pada pendinginan maka oligonukleotida primer yang berlebih akan berhibridisasi pada kedua utas yaitu utas DNA lama dan utas DNA baru. Kemudian pendinginan berikutnya dan polimerisasi akan terbentuk 4 pasangan rantai baru, masing-masing satu dari tiap cetakan. Jadi tiap siklus terdiri dari: (1) pemanasan untuk proses denaturasi (temperatur denaturasi/melting=94°C), (2) pendinginan untuk

proses hibridisasi (temperatur annealing=50°C),(3) inkubasi dengan enzim polimerase dan dNTP untuk proses polimerasi (temperatur polimerasi=72°C). Bila digunakan 2 oligonukleotida primer dalam 30 siklus, segmen DNA akan diamplifikasi mendekati 2^{30} kali ($\approx 10^6$). PCR yang semula menggunakan fragmen Klenow E-Coli-DNA polimerase I yang cepat rusak pada pemanasan tahapI- poses denaturasi, sehingga perlu ditambahkan enzim polimerase yang baru pada setiap siklus. Untuk mengatasi hal ini diketemukan bakteri thermofilik yang lebih tahan panas, yaitu : *Thermus Aquaticus* (=Tag DNA polimerase) dimana enzim ini stabil sampai suhu 95°C sehingga tidak perlu ditambahkan enzim baru pada setiap siklus reaksi. Pada alat yang tersedia blok-blok pemanas, dimana dapat dilakukan reaksi 40 sampel sekaligus, untuk 30 siklus dibutuhkan waktu kira-kira 3 jam.



Gb. 2.2. Skema PCR

2.1.9 Reagensia PCR

Reagensia PCR terdiri dari (1) Primer berupa oligonukleotida yang dipakai untuk memulai PCR, paling sedikit 16 nukleotida, idealnya 20-24 nukleotida. (2) Buffer, terdiri dari 50 mM KCl, 10mM Tris HCl (pH=8,3 pada suhu kamar) dan 1,5 mM MgCl₂, yang pada pemanasan 72°C menjadi 7,2. (3) Taq DNA polimerase yaitu enzim yang berasal dari pemurnian enzim *thermusaquaticus* atau enzim yang disintesis dari rekayasa genetika dalam *E.Coli (Ampli Tag™)* bermanfaat untuk katalisa reaksi polimerisasi dari arah 5'--->3'.(4) dNTP, dengan larutan jenuh 200 mM tiap dNTP.

2.1.10 Perbandingan PCR dengan RFLP

Antara PCR dan RFLP terdapat **persamaan** dan **perbedaan**. Beberapa **persamaan** antara PCR dan RFLP yaitu bahwa kedua metode mempunyai *marker* genetik pada panjang segmen DNA yang sangat bervariasi dan diturunkan. Regio DNA (lokus genetik) merupakan variabel DNA yang panjangnya kurang dari 0,1% DNA secara keseluruhan. Dengan demikian untuk setiap teknik, mengidentifikasi lokus genetik yang berada dalam DNA non-informatif sebesar 99,9% merupakan tahapan yang kritis.

Strategi 1: Primer -amplifikasi (PCR). Menggandakan berjuta-juta target lokus DNA, dengan demikian meniadakan DNA non informatif sebesar 99,9%.

Strategi 2: *Probe* (RFLP). Menggunakan suatu fragmen komplementer DNA (*probe*) untuk ditujukan (dengan ikatan fisik) terhadap target lokus DNA. Jika *probe* tersebut membawa signal (petanda), maka 99,9%+ DNA non-informatif (tempat *probe* tidak terikat) tidak akan terganggu.

Perbedaan yang jelas antara *PCR* dan *RFLP* yaitu: (1) Loci *RFLP* panjangnya beribu-ribu *base pair*, dan sangat bervariasi, (2) Sekuen DNA yang panjang tidak teramplifikasi secara efisien, sehingga *PCR* hanya menggunakan loci yang mengandung beberapa ratus *base pair* panjangnya, sehingga akibatnya kurang bervariasi dibandingkan loci *RFLP*.

Konsekuensi : (1) *RFLP* merupakan teknologi yang lebih canggih (lebih bervariasi per lokus genetik), dengan faktor kekuatan sama dengan 3 (3 tes *PCR*=1 tes *RFLP*), (2) Spesimen yang tidak ditangani atau tidak disimpan secara baik akan mengalami degradasi (DNA akan mengalami degradasi pada lokasi random). Misalnya, jika ada satu kerusakan setiap seribu *base pair*, maka sebagian besar segmen, katakanlah 3000 bp panjangnya tidak akan dapat bertahan sehingga tidak dapat dilakukan *RFLP*, sedangkan banyak segmen dengan panjang 300 bp bertahan untuk penggandaan (*PCR*) Perbedaan ini tidak penting untuk spesimen darah yang segar, steril, tetapi penting perannya terhadap spesimen yang tidak diketahui riwayatnya akibat tindak kejahatan. (3) *PCR*, merupakan teknik amplifikasi, yang dapat mendeteksi jumlah DNA yang lebih sedikit dibandingkan *RFLP* dengan demikian lebih sensitif.

Korelasi kedua metode tersebut adalah: (1) Berdasarkan kenyataan bahwa variasi dasar pada lokus genetik adalah panjang sekuen DNA, maka untuk kedua teknik tersebut fragmen DNA harus diukur (*size*). Hal ini dilakukan baik untuk teknik *PCR* maupun *RFLP*, dengan melakukan separasi fragmen DNA menurut ukurannya menggunakan teknik yang disebut elektroforesis, (2) Bila suatu *match* ditemukan, maka tingkat kemaknaan hanya dapat ditentukan dengan merujuk pada data base yang sesuai untuk setiap tes yang menunjukkan frekuensi setiap segmen DNA. Data base untuk setiap lokus genetik ditata berdasarkan ras atau etnik.

2.1.11 Penentuan Jenis Kelamin dengan analisis *Polymerase Chain Reaction*

Akhir-akhir ini sexing DNA manusia dengan PCR dilakukan dengan amplifikasi sekuen tunggal atau ganda. Amplifikasi gen X-Y homolog menghasilkan keuntungan suatu kontrol positif internal karena kedua sekuen X dan Y dapat diamplifikasi dengan suatu reaksi tunggal (Kevin, 1993). Demikian juga, kedua sekuen adalah dari equal (single) copy number tidak seperti pada analisis dari sekuen X dan Y-specific repetitive. Ini memudahkan dalam interpretasi hasil amplifikasi.

Salah satu tehnik PCR untuk identifikasi jenis kelamin bahan biologis forensik ialah dengan amplifikasi dari gen X-Y homolog amelogenin (Akane, 1992 ;Mannucci A, 1994). Amelogenin adalah suatu konstituen mayor dari protein pembentukan matrik enamel. Ada 2 gen amelogenin, satu pada kromosom X dan yang lainnya pada kromosom Y. Peta dari gen amelogenin manusia pada regio p22 pada kromosom X dan pada gen kromosom Y telah dipetakan. (Sasaki & Shimokawa, 1995). Dengan menggunakan suatu pasang primer tunggal yang mencakup sebagian dari intron pertama, akan dihasilkan suatu produk PCR dari X dan Y homolog, yang kemudian diuraikan dengan suatu agarose gel electrophoresis. Tes ini dapat digunakan untuk mendeteksi DNA sebesar 20 pg (Mannucci ; Sullivan ; Ivanov ; Gill , 1994).

2.1. 12 *Silver staining*

Untuk Visualisasi DNA dalam agarosa hasil elektroforesis umumnya peneliti menggunakan *ethidium bromide*, bahan yang bersifat mutagenik. Perbandingan kadar etanol, asam asetat glacial dan glyserol dalam tahapan fiksasi yang sangat berpengaruh pada hasil Pengecatan Perak perlu diteliti dan ditentukan supaya menghasilkan pengecatan DNA pada gel agarosa yang berkualitas dan sensitivitas tinggi untuk dapat menggantikan *ethidium bromide*

DNA dalam gel harus di cat supaya dapat dilihat. DNA dapat dicat dengan bahan yang berfluorescensi dan cat kimiawi. Penggunaan ethidium bromide, suatu cat yang berfluorescensi ultraviolet(UV) harus hati hati karena dapat menyebabkan kanker dan mutasi DNA. Penggunaan cat kimiawi seperti methylene blue meskipun aman namun kurang sensitive . Sejak dioerkenalkan metoda 'Pengecatan Perak' yang sangat sensitive untuk analisis Protein dan DNA dalam gel Agarosa dan Polyacrylamide, banyak variasi dan metoda alternatif telah dilaporkan (Switzer et all, 1979; Oakley, 1980; Sommersville, 1981) . Namun kebanyakan macam macam metoda yang dilaporkan adalah untuk gel polyacrylamide, yang tidak cocok untuk pengecatan gel Agarosa karena perbedaan dalam komposisi kimiawi dari kedua macam matriks tersebut.

Hal ini disebabkan karena matrik agarosa mempunyai kondisi yang memungkinkan deposisi dari ion perak yang akan menghasilkan latarbelakang yang kotor dan gelap (Willoughby, 1983; Peats, 1983) . Untuk menanggulangi itu dianjurkan untuk melakukan tahap 'pretreatment' dengan $K_2Cr_2O_7$ atau $Na_2S_2O_3$, penambahan $ZnSO_4$ atau garam garam logam dalam larutan fiksasi, memperpanjang waktu pengeringan gel ,yang mana ini merupakan kelemahan dan hambatan untuk aplikasi klinik. Penelitian ini dilakukan dalam upaya mempelajari pengaruh dan mencari perbandingan kadar etanol, asam asetat glacial dan glyserol pada tahap fiksasi yang tepat untuk meningkatkan kualitas dan sensitivitas hasil pengecatan dengan perak pada gel agarosa sehingga akan memperpendek menyederhanakan dan mempermudah pengecatan dengan perak.

1. Apa yang menyebabkan timbulnya latar belakang yang kotor dan gelap pada pengecatan perak di gel agarosa2. Apa pengaruh etanol, asam asetat glacial dan glyserol yang merupakan bahan fiksasi DNA terhadap kualitas dan sensitivitas

pengecatan perak³. Berapa kadar bahan bahan fiksasi dan lama waktunya fiksasi yang optimal untuk menghasilkan visualisasi DNA yang baik dan sensitive.

Penelitian ditujukan untuk mencari cara yang sederhana aman dan cepat untuk visualisasi DNA dalam gel Agarosa dengan pengecatan perak untuk aplikasi rutin di klinik yang akan dapat menggantikan Ethidium bromide yang karsinogen . Prieto dkk. (1997) melaporkan suatu metoda pengecatan perak untuk DNA dalam gel Agarose tanpa 'pretreatment atau pengeringan' .

Namun cara ini terdapat kelemahan yaitu selain menyebabkan gel jadi rapuh juga hanya dipakai pada gel agarosa dengan TAE, sedangkan banyak aplikasi pemeriksaan menggunakan TBE sebagai buffer.

Dengan mempelajari perilaku perubahan pada kadar bahan bahan fiksasi yang bermacam macam dapat diprediksi respons media gel agarosa terhadap pengecatan perak, yang berguna untuk merancang suatu protokol baru khusus untuk pengecatan DNA pada gel agarosa.

Pengecatan dengan perak -*Silver staining* telah diperkenalkan lebih dari sepuluh tahun yang lalu sebagai suatu prosedur yang sensitive untuk mendeteksi protein dengan kadar yang sangat kecil dalam gel *polyacrylamide* (Switzer, 1979). Sejak itu 'silver staining' dipergunakan dengan memuaskan untuk mempelajari molekul biologis lain yang diseparasi dengan electrophoresis dalam berbagai media (Merril, 1990; Rabilloud, 1990). Ada dua metoda *Silver staining* yaitu: Satu menggunakan diamine atau larutan perak ammoniakal untuk 'gel impregnation' dan larutan encer formaldehyde untuk pembentukan pita DNA . Metoda yang lain *impregnates* dengan perak nitrat dalam suasana asam lemah dan menggunakan formaldehyde untuk mereduksi perak dalam suasana basa Banyak metode telah dikembangkan (Blum,

1987; Hochstrasser, 1989; Bassam Caetano, 1991) dengan hasil yang memuaskan untuk pengecatan DNA pada *polyacrylamide*.

Hampir semua protokol menghasilkan reduksi perak menjadi *metallic silver*, yang kemudian di endapkan. Untuk mendapatkan gambaran yang optimum dan kontras, derajat reduksi dari perak dalam gel harus dibuat minimum, biasanya dengan pengikatan perak atau dengan *enhancing pre-treatments* dari matrik gel sebelum *silver impregnation*. Ini dapat dilakukan dengan modulasi yang tepat dari proses reduksi, yang tergantung pada pH, konsentrasi absolut dan relative dari perak dan bahan pereduksit, dan konstanta kecepatan reaksi. Proses ini bukan pengaruh thermo dinamik, tetapi lebih tergantung pada kinetika dari reduksi perak. Umumnya waktu yang digunakan untuk pengecatan gel yang lebar dan tebal lebih lama.

Protokol untuk pengecatan perak dibagi menjadi tiga tahap yaitu:

1. Tahap FIKSASI

2. Tahap 'STAINING' - 'Silver impregnation'

3. Tahap 'DEVELOPING' diikuti tahap 'STOP' untuk memberhentikan reaksi, bila gambaran yang dikehendaki sudah timbul. Pada *polyacrylamide* gel pengecatan perak adalah sangat sensitive dan reliabel, deteksi limitnya untuk 'double-stranded DNA' kira kira 1pg/mm² penampang pita (Bassam, 1991; Caetano, 1998). Untuk fragmen 100bp limit deteksinya 0.3pg/mm², sedangkan untuk 1000bp adalah 3pg/mm². Ini setara dengan derajat kepekaan dari deteksi menggunakan radioactive atau label fluorescent. Penelitian atau protokol untuk pengecatan pada gel agarosa belum banyak dan hasilnya masih jauh dari memuaskan.

Salah satu tahapan yang penting dari pengecatan adalah tahapan FIKSASI, suatu tahap yang dianggap bertanggung jawab untuk menghalangi difusi dari

molekul DNA dalam matrik gel , juga membantu menghilangkan dan menetralsir bahan kimia yang tidak dikehendaki (seperti urea, larutan buffer). Fiksasi adalah sangat penting untuk meningkatkan kualitas dan sensitivitas dari hasil.pengecatan.

Penelitian pendahuluan dengan meniadakan tahap fiksasi atau memperpendek waktunya menghasilkan gambaran pita yang sangat jelek , sedangkan memperpanjang waktu fiksasi akan menghasilkan '*band fading*'. Minimum diperlukan 5 menit untuk fiksasi dan ini tergantung juga masih pada beberapa faktor seperti kadar etanol, asam asetat glacial dan glycerol yang merupakan bahan utama fiksasi dan ini yang masih belum diteliti.

2.2 Penentuan Jenis Kelamin secara Antropologi Ragawi

Dalam menentukan Jenis Kelamin tengkorak secara Antropologi Ragawi, maka mempelajari dimorfisme seksual kraniofacial adalah hal yang mutlak. Sebagai dasar ialah pertumbuhan dan perkembangan bagian tubuh ini, seperti yang dikatakan oleh Aristotle (circa 330 B.C.E) : “ *He who sees things from beginnings will have the most advantageous view of them*”.

Ada tiga macam proses mekanisme pembentukan tulang tengkorak yaitu:

- a. Tulang berasal dari osifikasi tulang rawan, disebut pertulangan endochondral.
contoh: tulang dasar tengkorak.
- b. Tulang berasal dari mesenkim yang secara langsung berdiferensiasi menjadi tulang, dikenal sebagai pertulangan membranosa. contoh: tulang pipih tengkorak.
- c. Tulang berasal dari kombinasi endochondral dan membranosa.
contoh: tulang mandibula.

Pertumbuhan keseluruhan tulang, yang menimbulkan pembesaran, merupakan fungsi dua fenomena yaitu *remodeling* yang merupakan kombinasi pertumbuhan pembesaran serta resorpsi tulang, dan transposisi yang merupakan pergeseran tulang yang telah mengalami *remodeling* atau sebaliknya. (Sperber, 1991)

2.2.1 Tengkorak

Tengkorak dibagi dalam dua bagian: (1) *Neurocranium*, yang membentuk batok pelindung otak, dan (2) *viserocranium*, yang membentuk kerangka wajah.

Neurocranium dibagi menjadi dua bagian (Enlow, 1975)

- a. bagian membranosa yang terdiri dari tulang pipih yang mengelilingi otak sebagai suatu kubah, yang dalam pertumbuhannya membesar melalui peletakan lapisan baru

di atas permukaan luar, dan melalui penyerapan osteoklastik yang berturut-turut dari arah dalam, dan

b. bagian kartilaginosa atau kondrokranium yang membentuk tulang dasar tengkorak, di mana pada permulaan terdiri dari sejumlah tulang kartilago yang terpisah-pisah dan kemudian menyatu dan menulang sehingga terbentuk dasar tengkorak.

Viserocranium terdiri atas tulang wajah dan terutama dibentuk oleh kartilago dua lengkung insang pertama. Lengkung pertama membentuk bagian dorsal, yaitu *processus maxillaris*, yang meluas ke depan di bawah daerah mata, menghasilkan *os maxillae*, *os zygomaticum* dan sebagian *os temporale*.

Bagian ventral, dikenal sebagai kartilago Meckel atau *processus mandibularis*. Mesenkim di sekitar kartilago Meckel memadat dan menulang oleh pertulangan membranosa, membentuk *os mandibulae*, sedang kartilago Meckel akan menghilang kecuali pada *ligamentum sphenomandibulare*. Ujung dorsal *processus mandibularis*, bersama-sama lengkung insang kedua membentuk *inkus*, *malleus* dan *stapes* yang akan mengalami pertulangan mulai bulan keempat dan ini merupakan tulang pertama yang mengalami penulangan penuh.

Bentuk dasar tulang dan ukuran tulang sudah ditentukan secara genetik (Sperber 1991). Bila bentuk dasar tulang sudah terbentuk, maka berbagai sifat tulang yang lain akan mulai terbentuk, misalnya *ridge/linea*. Bentuk dasar tulang juga dipengaruhi oleh faktor gizi, hormon, dan fungsi. Karena tulang mengalami proses pergantian yang terus menerus secara lambat sepanjang kehidupan, maka tulang akan memberi respon terhadap tekanan fungsional.

Berdasar pada pengaruh otot pada bentuk tulang, ada tiga kelas bentuk tulang kraniofasial (Sperber, 1991).

1. Yang tidak pernah terbentuk bila tidak ada otot, misalnya garis temporal, garis

nuchal

2. yang dapat membelah sendiri, tetapi tetap memerlukan otot untuk tetap bertahan, misalnya *prosessus angularis* rahang bawah
3. yang sangat tergantung pada otot, misalnya *os zigomaticum* atau *os mandibulae*.

Menurut Sperber (1991), ada beberapa teori yang menunjang perubahan struktur tulang akibat pengaruh tekanan otot ini yaitu:

- a. Mekanismenya melalui arus piezo-listrik dari faktor biomekanis di mana diperkirakan osteoblas, osteoklas dan matrik akan membentuk tulang pada daerah arus negatif sebagai reaksi terhadap kandungan listrik.
- b. Hipotesis mekanokimia di mana tekanan mekanis dihantarkan ke aktivitas osteoblas atau osteoklas yang akan menimbulkan tegangan dari kristal hidroksiapatit yang akan merubah kelarutannya, merubah aktivitas kalsium lokal yang dapat merangsang atau meresorpsi tulang.

2.2.2 Perkembangan kraniofasial

Perkembangan kepala, yang terdiri dari kranium dan rahang bawah, merupakan gabungan dari morfogenesis dan pertumbuhan ketiga bagian utama kepala, yang berasal dari *neural crest* dan jaringan mesodermal parakasial dan tergantung aktivitas induksi pusat pengatur prosensefalik dan rombensefalik (Sperber, 1991).

Karena *calvarium* dan dasar tengkorak berkembang secara sinkron dengan otak, dan karena organ ini tidak berkembang seperti balon bulat maka bagian neurokranium ini akan menunjukkan pola pertumbuhan secara diferensial. (Ranly, 1988)

Setiap bagian kraniofasial mempunyai sifat pertumbuhan, perkembangan, penyempurnaan dan fungsi yang berbeda-beda, tetapi setiap unit tetap berhubungan dengan unit lainnya, sehingga diperlukan pertumbuhan yang teratur untuk terjadinya perkembangan yang normal (Enlow, 1982, Sperber, 1991).

Pada permulaan pertumbuhan, wajah adalah kecil dibandingkan neurokranium karena belum adanya *sinus para nasales* yang berisi udara dan ukuran tulang yang kecil, khususnya rahang bawah. Dominasi *neurocranium* terhadap wajah paling besar pada awal masa fetus karena otak dan tulang *neurocranialnya* berkembang dengan sangat cepat serta sangat awal, namun pertumbuhan ini akan melambat dan berhenti pada usia lebih dini dari pada elemen wajah dan kunyah. Bila pada saat lahir perbandingan *neurocranium* berbanding wajah 8 : 1 maka pada tahun kedua , 6 : 1 , pada tahun kelima 4 : 1 dan pada orang dewasa 2 - 2,5 : 1. Pada saat lahir, neurokranium sudah mencapai ukuran 25 % pertumbuhan optimal; 50 % pada umur 6 bulan dan 75 % pada umur 2 tahun. Pada umur 10 tahun mencapai 95 %, sedangkan wajah baru mencapai 65 % pertumbuhan maksimal.

Berbeda dengan neurokranium, diferensiasi dan pertumbuhan kondrokranium sudah ditentukan secara genetik, dan hanya sedikit terpengaruh oleh lingkungan (Sperber, 1991).

2.2.3 Pengaruh Jenis Kelamin

Sebelum umur pubertas perbedaan tengkorak laki-laki dan perempuan tidak nyata. Pada umur 6 tahun baik pada laki-laki maupun perempuan pertumbuhan transversal tengkorak sudah mendekati ukuran dewasa, sedangkan pertumbuhan vertikal lebih lambat. Perbedaan antara laki-laki dan perempuan pada masa ini terletak pada lebar kepala, wajah dan maxilla. Setelah mencapai umur 12 tahun terdapat perbedaan juga pada lebar intermolar maxilla dan mandibula, dan pada umur pubertas sekitar 18 tahun terdapat perbedaan pada semua variabel kecuali lebar nasal dan intermolar mandibula (Thilander, 1995).

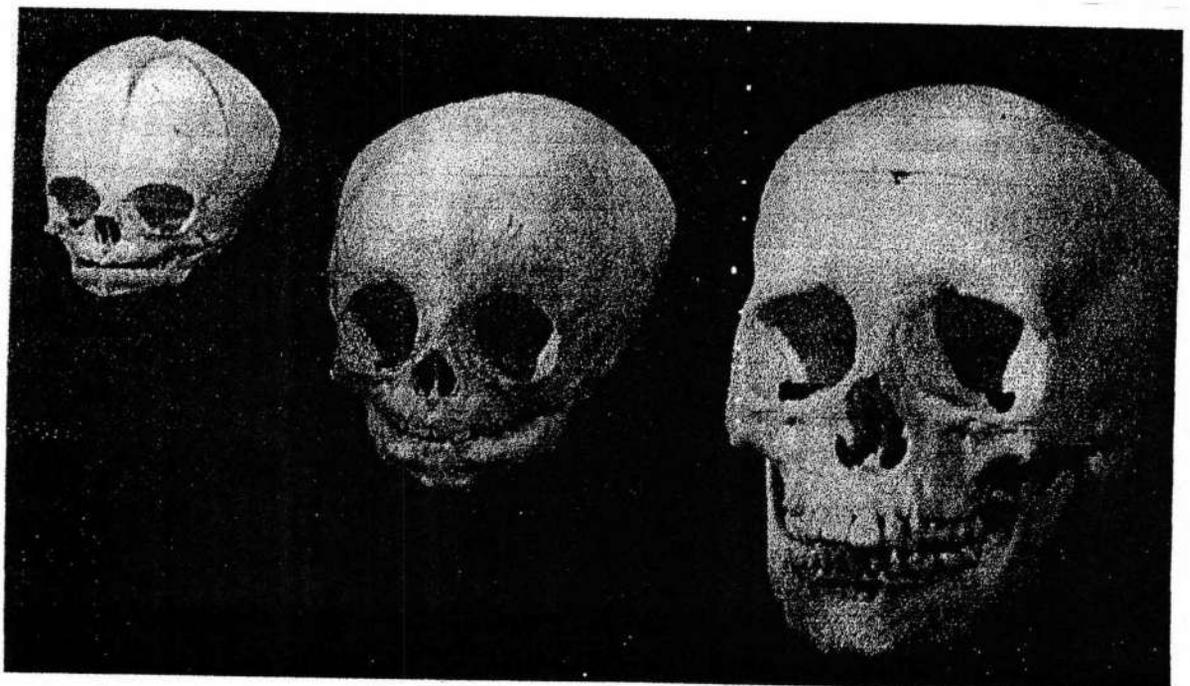
Pada umur dewasa tengkorak perempuan umumnya lebih ringan, kecil, dan kapasitasnya lebih kecil sekitar 10% dibanding laki-laki. Dindingnya lebih tipis dan

tonjolan tempat melekatnya otot kurang nyata; *glabella*, *arcus superciliaris*, *processus mastoideus* kurang menonjol, dan sinus-sinusnya kecil dan rudimenter. Tepi atas orbita tajam, dahi lebih vertikal, tonjolan frontal dan parietal lebih prominent, sedangkan batok kepala lebih datar. Kontur wajah lebih bulat, tulang fasial lebih halus, maxilla dan mandibula beserta gigi geligi lebih kecil.

Berdasar ciri-ciri di atas dan kenyataan bahwa wanita lebih cepat mencapai masa pubertasnya yang pada umur 13 pertumbuhan mulai melambat dan berhenti

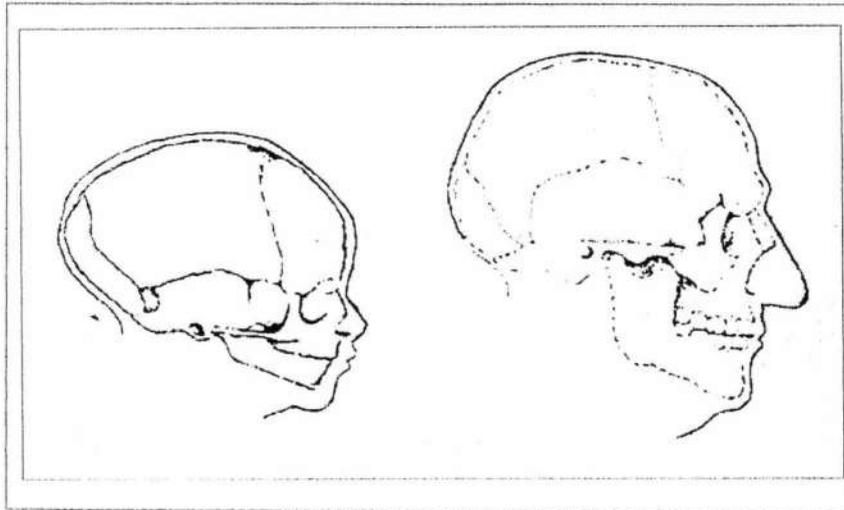


Gb 2.3 Perkembangan kraniofasial (Sperber, 1991)

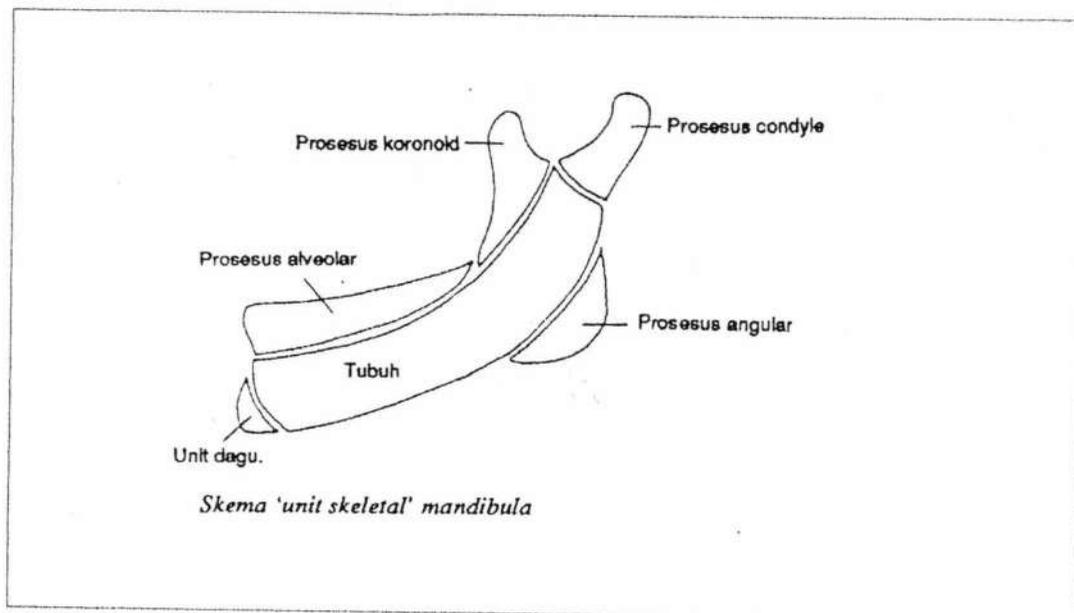


Gb 2.4. Perkembangan rangka wajah (Sperber, 1991)

pada umur sekitar 17 sampai 19 tahun, sedang pada laki-laki pada umur 15 mulai melambat dan bahkan masih berkembang sesudah umur 20 tahun, maka karakteristik



Gb2.5 Pertumbuhan dan perkembangan bagian belakang kepala dan dahi



Gb 2.6 Pusat osifikasi *os mandibulae*

pedomorf lebih banyak terdapat pada wanita dibandingkan laki-laki (Gray, 1954; Lestrel, 1986; Sadler, 1993).

2.2.4 Dimorfisme Seksual

Istilah dimorfisme diambil dari bahasa Yunani yaitu di berarti berganda, morphe berarti bentuk. Dalam antropologi ragawi istilah dimorfisme dipakai untuk melukiskan perbedaan antara organisme laki-laki dan wanita, yang nyata dalam morfologi, fisiologi dan kondisi psikis. Ternyata, bahwa organisme manusia, seperti juga pada binatang, berkembang berbeda, sesuai dengan jenis kelamin individu.

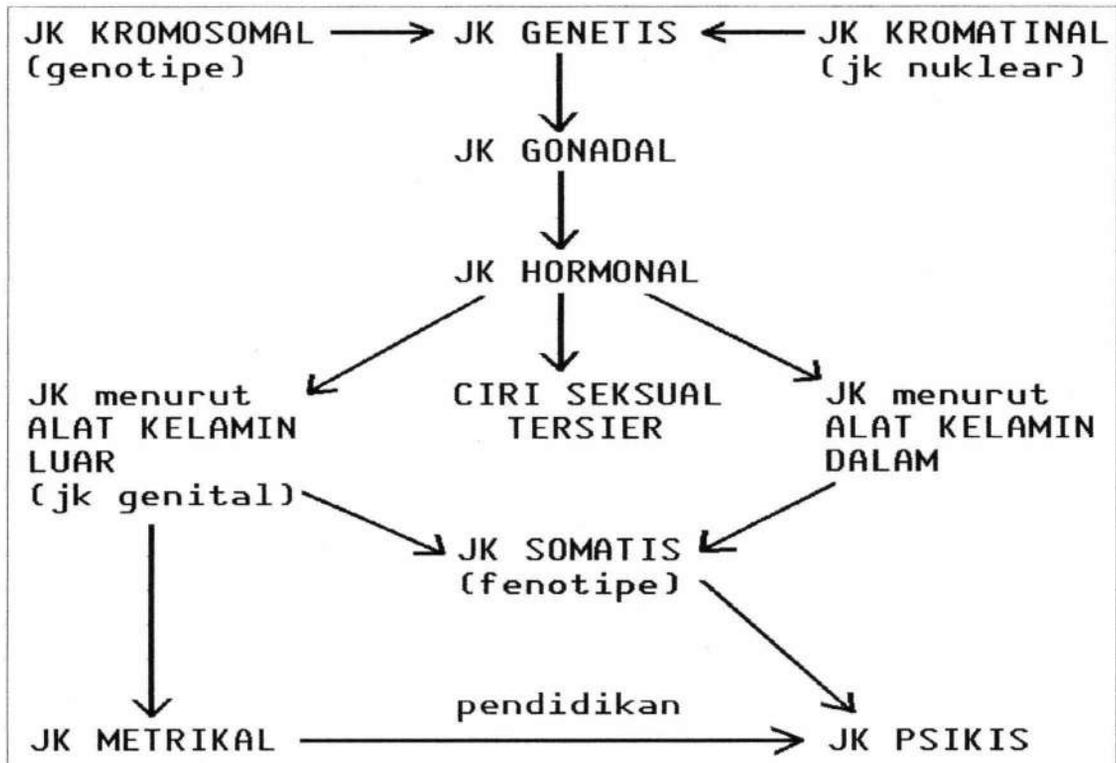
Seksual, seks berasal dari bahasa Latin *sexum*, pembagian, memotong, memisahkan. Dalam biologi, istilah seks dipakai dalam arti luas, yang menyangkut baik kekhasan struktural maupun fungsional yang membedakan pria dan wanita satu sama lain, dan bukan hanya perilaku seksual saja (Glinka, 1992).

2.2.5 Pengertian jenis kelamin

Jenis kelamin mempunyai beberapa arti yang berbeda. Dibedakan jenis kelamin kromosomal, kromatinal, gonadal, hormonal, somatis, metrikal dan psikis. Jenis kelamin kromosomal ditentukan oleh kromosom seksual. Jenis kelamin kromatinal ditentukan oleh kromatin seksual X (Barr Body). Jenis kelamin kromosomal dan kromatinal disebut jenis kelamin genetis. Jenis kelamin gonadal ditentukan oleh testis pada laki-laki dan ovaria pada perempuan yang mulai terbentuk bulan ke tujuh intrauterin. Jenis kelamin hormonal atau metabolis ditentukan oleh kualitas dan kuantitas hormon seksual. Kedua kelenjar kelamin memproduksi baik androgen maupun estrogen, tetapi jauh lebih banyak androgen diproduksi oleh testis dan jauh lebih banyak esterogen oleh ovaria. Hormon seksual menentukan ciri seksual sekunder dan tersier. Androgen diproduksi juga oleh kelenjar anak ginjal, sehingga kadar androgen dan esterogen dalam serum darah dapat menimbulkan kesalahan

dalam menentukan jenis kelamin hormonal (perempuan ditentukan sebagai laki-laki). Jenis kelamin somatis ditentukan oleh perkembangan alat kelamin dalam dan alat kelamin luar yakni penis dan scrotum pada laki-laki dan vagina pada perempuan.. Jenis kelamin somatis umumnya nyata dalam bentuk badan : tinggi badan, volume, proporsi badan, pilositi, bentuk tengkorak, bentuk panggul, bentuk ekstremitas.

Jenis kelamin metrikal (surat kelahiran, sosial) ditentukan pada waktu kelahiran berdasarkan alat kelamin luar. Jenis kelamin psikis adalah perasaan jenis kelamin, yang ditentukan dalam perkembangan ontogenetis dan pendidikan. Adakalanya orientasi psikoseksual terganggu, sehingga orientasi seksual psikis berlawanan dengan jenis kelamin genetik dan fenotipis. Hal ini disebut interseksualisme (Glinka, 1992)(lihat gambar 2.7)



Gb 2.7 : Bagan jenis kelamin (Glinka, 1992)

2.2.6 Beberapa fakta dimorfisme seksual

Dimorfisme seksual yaitu perbedaan fisik antara laki-laki dan perempuan (Poirier, 1994), bukan hanya kekhasan manusia, tetapi juga dikenal dalam hampir seluruh fauna, dan terlihat juga pada semua primata, namun intensitasnya berbeda. Pada umumnya dimorfisme kurang terlihat pada spesies monogam, pada spesies poligam perbedaan ini jauh lebih jelas. Hal ini agak jelas terlihat pada besarnya badan. Pada spesies poligam jantan umumnya berbadan jauh lebih besar daripada betina (Glinka, 1992). Derajat dimorfisme seksual adalah pertimbangan yang penting dalam mengevaluasi suatu kerangka, sisa kerangka atau fosil, spesimen laki-laki harus dipelajari dan dibandingkan dengan spesimen laki-laki dan spesimen perempuan dengan spesimen perempuan (Poirier, 1994).

Dimorfisme seksual mempunyai dasar genetis. Kromosom XX menentukan jenis kelamin perempuan, kromosom XY menentukan jenis kelamin laki-laki. Kromosom-kromosom seksual ini mengakibatkan kepekaan selektif sel-sel organ serta organisme seluruhnya terhadap hormon-hormon seksual : esterogen pada perempuan, testosteron pada laki-laki. Proses perkembangan dimorfik bervariasi baik pada individu masing-masing maupun pada ras-ras berbeda. Dalam tujuh minggu pertama pragonade-pragonade yang masih biseksual, berkembanglah testis atau ovaria. Produksi hormon androgen pada laki-laki dan esterogen pada perempuan dalam proporsi tertentu menentukan perkembangan embrio selanjutnya. Androgen terutama dibentuk oleh kelenjar testes, esterogen oleh ovaria. Sekitar bulan ke lima hidup intrauterin terbentuk alat kelamin ekstern. Pada embrio dimorfisme seksual sangat minimal dan diduga tidak melebihi 2-3%. Ciri-ciri dimorfi mulai berkembang jelas pada masa pubertas dan dalam usia dewasa mencapai 8%. Hormon-hormon seksual mempengaruhi tidak hanya perkembangan alat kelamin, melainkan juga

berbagai proses perbedaan lainnya, yang terlihat dalam besarnya serta proporsi badan. Androgen memperlambat pertumbuhan sistem kerangka dan otot. Hormon ini dibentuk oleh kelenjar-kelenjar anak ginjal (*glandula suprarenalis*) dan juga pada laki-laki dalam masa pubertas oleh testes, yang memperkuat perbedaan dimorfisme pada waktu ini. Perkembangan panggul, buah dada, lapisan adiposa, metabolisme khas bagi perempuan serta resistensi lebih kuat terhadap pengaruh lingkungan disebabkan oleh esterogen (Ranly, 1988, Glinka, 1992).

Dimorfisme seksual, yang nyata baik dalam perbedaan struktural maupun fungsional, berkaitan dengan perbedaan fungsi dalam proses reproduksi.

Beberapa ahli berpendapat, bahwa dapat dibedakan dua bentuk yang ekstrim yaitu ekstrim maskulin dan ekstrim feminin. Pada morfotipe maskulin bagian badan atas berkembang lebih kuat, kepala agak besar, profil wajah jelas, leher lebih kuat dan tebal, gelang bahu kuat, panggul agak sempit dibandingkan dengan bahu. Morfotipe ekstrim feminin memiliki proporsi terbalik: kepala agak kecil, gelang bahu sempit dan gelang panggul lebar. Pada umumnya perempuan lebih kecil (tinggi dan berat badan), dengan badan lebih kuat serta batang badan lebih panjang dibandingkan dengan tungkai, lengan perempuan lebih pendek dibandingkan dengan tungkai. Adiposa yang lebih tebal dan kerangka serta otot yang lebih halus menyebabkan morfotipe perempuan agak lebih pedomorf. Lordosis dan kyfosis tulang belakang perempuan lebih besar. Sendi siku perempuan juga lebih fleksibel, sehingga posisi, kalau tangan disambung dan diletakkan di atas meja, misalnya memperlihatkan lengan tangan berbentuk V pada laki-laki dan berbentuk Y pada perempuan (Glinka, 1992)

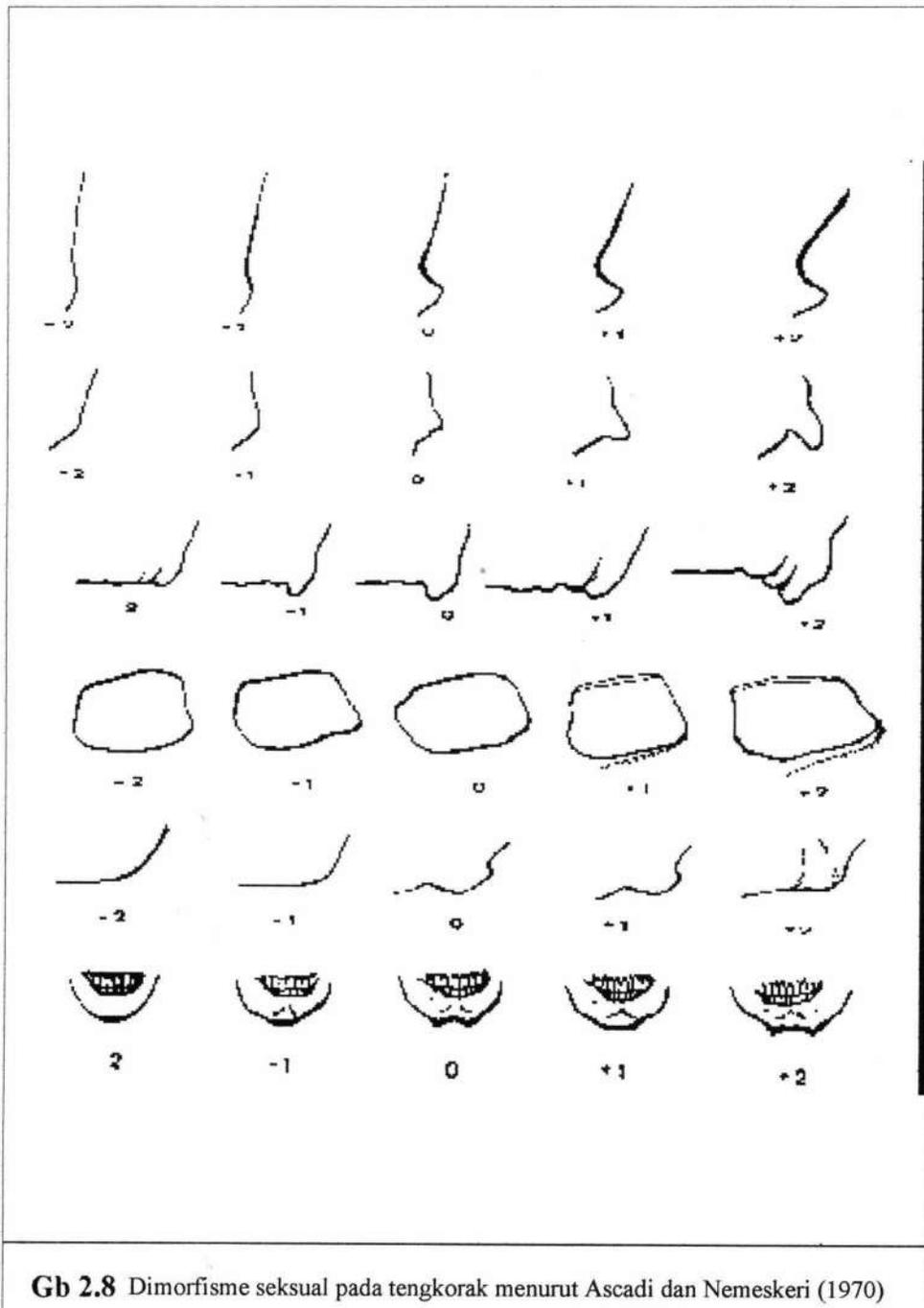
Tengkorak perempuan lebih kecil dan lebih pendek, sehingga membuat bentuk lebih bulat. Volumennya juga lebih kecil : sekitar 1500 cm³ pada laki-laki dan sekitar 1300 cm³ pada perempuan. Tulang pada laki-laki lebih tebal dan lebih berat,

segala tonjolannya juga lebih nyata (*linea temporalis*, *linea nuchae*, *protuberantia occipitalis externa*) akibat otot laki-laki lebih kuat.

Dahi perempuan lebih tegak, dahi laki-laki lebih miring. Arcus superciliaris pada laki-laki lebih menonjol, padahal pada perempuan dua tuber frontale lebih nyata, juga terhadap tuber parietale. Pada laki-laki processus mastoideus lebih besar dan permukaannya lebih terukir. Pinggir atas tulang orbita laki-laki lebih tumpul dibandingkan dengan pinggir orbita perempuan yang agak tajam. Wajah perempuan lebih rendah dengan orbita lebih tinggi. *Processus alveolaris* perempuan kurang membulat. Mandibula perempuan umumnya lebih halus dengan tonjolan lebih kecil pula (*protuberantia mentalis*, *angulus mandibulae*) dan badannya (*corpus mandibulae*) lebih rendah. Sudut antara corpus dan ramus mandibulae lebih terbuka pada perempuan. Pada panggul bukan hanya lebar dan letaknya kedua tulang panggul (*os coxae*), tetapi juga proporsi antara tulang duduk (*os ischii*) dan tulang kemaluan (*os pubis*) berbeda pada laki-laki dan perempuan. Sudut yang terbentuk oleh kedua tulang kemaluan (*arcus pubis*) pada perempuan lebih besar 90 derajat, pada laki-laki lebih kecil 90 derajat. Berhubungan dengan perbedaan dalam panggul terdapat juga perbedaan dalam sudut yang terbentuk oleh poros utama badan tulang paha (*corpus femoris*) dan poros lehernya (*collum femoris*), pada perempuan sekitar 115 derajat dan pada laki-laki sekitar 135 derajat. Proporsi antara *manubrium sterni* dan *corpus sterni* juga berbeda; pada perempuan indeksinya berkisar 54, pada laki-laki 46 (Glinka, 1992).

Titik berat badan perempuan terletak lebih rendah. Tungkai lebih pendek dibandingkan dengan batang badan. Adiposa pada perempuan terkumpul terutama pada gelang panggul, pada laki-laki terutama pada gelang bahu. Pada perempuan

adiposa sebesar 24-28%, otot merupakan sekitar 36% seluruh berat badan, pada laki-laki 15-18% dan sekitar 42% (Glinka,1992).



2.2.7 Dimorfisme seksual kegunaan dan permasalahannya

Sumber dari sebagian besar, atau bahkan mungkin seluruh, ilmu-ilmu biologi berdasarkan pada studi mengenai bentuk (Lestrel, 1974).

Dari semua karakteristik demografik, perbedaan-perbedaan diantara jenis-jenis kelamin mungkin yang paling banyak dipelajari dan diteliti dan hampir semua tulang-tulang dari manusia telah dianalisa (Steward, 1979; Krogman, 1986; Iscan, 1993). Di samping kepentingannya dalam bidang Forensik, suatu pemahaman dari dimorfisme seksual juga merupakan dasar dari studi yang menyangkut pertumbuhan dan evolusi manusia.

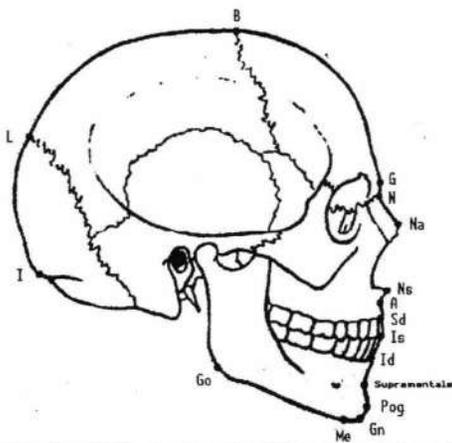
Meskipun terdapat perbedaan yang jelas dan telah banyak penelitian mengenai dimorfisme seksual, penentuan jenis kelamin dari kerangka dalam beberapa kasus dapat menimbulkan masalah. Terdapat perbedaan yang nyata antara kerangka yang masih mengandung jaringan kulit dan otot dengan apa yang terlihat pada tulangnya.

Problem berasal dari kontradiksi antara klasifikasi seks berdasarkan genetik dan karakteristik seks somatik pada fenotipe. Suatu analisis perbedaan seksual selalu menunjukkan *overlapping* tertentu di antara kedua seks (Iscan M Y, 1993).

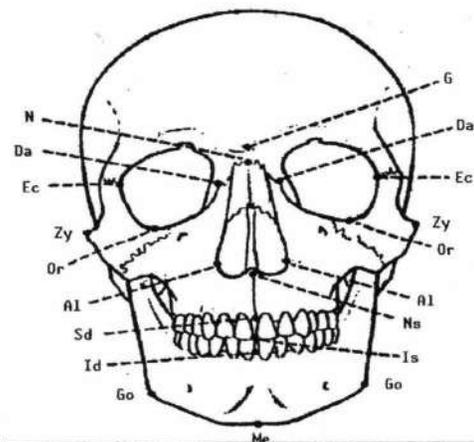
Pada kerangka, seks tidak *binary*, meskipun manusia normal adalah kalau tidak pria, ya perempuan. Ini disebabkan pengaruh beberapa faktor seperti lingkungan, perbedaan umur, perubahan patologik, dan di atas segalanya variasi interpopulasi.

Pelvis dan tengkorak adalah tulang-tulang yang paling baik untuk seksing. Ketepatannya mencapai 100% bila ditemukan *pelvis* lengkap, 95% bila hanya *pelvis* dan 92% bila hanya tengkorak saja (Krogman, 1986; Iscan, 1993). Meskipun dimorfisme seksual lebih baik pada tulang-tulang *pelvis*, tetapi bagian ini seringkali rusak, sedangkan **tengkorak biasanya terawatkan lebih baik** (Iscan, 1993).

Tengkorak manusia menunjukkan perbedaan sex yang cukup berarti setelah pelvis, dan diakui sebagai indikator sex yang dapat dipercaya untuk sisa-sisa kerangka manusia dewasa (El-Najjar, 1978; Rathbun, 1984; Krogman, 1986; Jamison, 1993). Untuk melakukan sexing tengkorak ada beberapa cara yang dapat dikerjkan yaitu metoda observasi visual dari bentuk secara morfologi-morfoskopik antroposkopi dan melakukan pengukuran titik antropometris (Gambar 2.9 dan Gambar 2.10 yang juga



Gb 2.9 Titik kraniometri lateral



Gb 2.10 Titik kraniometri frontal

disebut metoda metrik atau morfometrik - antropometri (El-Najjar, 1978; Glinka, 1990; Iscan, 1993). Evaluasi secara osteokopis lebih condong subyektif dan akurasinya tergantung semata mata pada pengalaman dari pemeriksanya. Dengan inspeksi dari tengkorak bagian rahang bawah umpamanya, Stewart dapat melakukan sexing dengan ketepatan 77 % (Inoue, 1992).

Karena antropometri konvensional merupakan suatu sistem dimana pengukuran variabel biometrinya berdasarkan titik-titik anatomi tertentu, maka dengan cara ini tidaklah mungkin mencakup bentuk biologis yang kompleks secara keseluruhan. Metoda metrik ini, meskipun kelihatannya lebih obyektif, juga dipengaruhi oleh pengalaman si pemeriksa. Dengan dasar pengetahuan dari

pengalaman bahwa tengkorak pria lebih besar dibandingkan tengkorak wanita, metoda metrik menentukan jenis kelamin (*sexing*) dari tengkorak berdasarkan besarnya-*size* (Boddington, 1987; Inoue, 1992; Jamison, 1993).

Sexing ini menjadi lebih akurat apabila tidak hanya dikerjakan dengan mengukur besarnya saja (*size*) tetapi juga dengan melihat proporsi dari ciri ciri morfologi tengkorak keseluruhannya. Pada rahang bawah umpamanya, perbedaan sex lebih baik dilihat dari sudut pandang bentuknya dari pada ukurannya (Loth, 1996).

Bentuk yang lebih halus dan lebih bulat merupakan karakteristik wanita sedangkan bentuk yang kasar dan persegi ciri umumnya pria (Inoue, 1990).

Jelas interpretasi bentuk berdasarkan pengamatan ini sangat tergantung pada pengalaman si pemeriksa dan sangat subyektif. Untuk memperbaiki akurasi dari *sexing* ini sebaiknya dilakukan kuantifikasi dari ciri ciri morfologi tersebut.

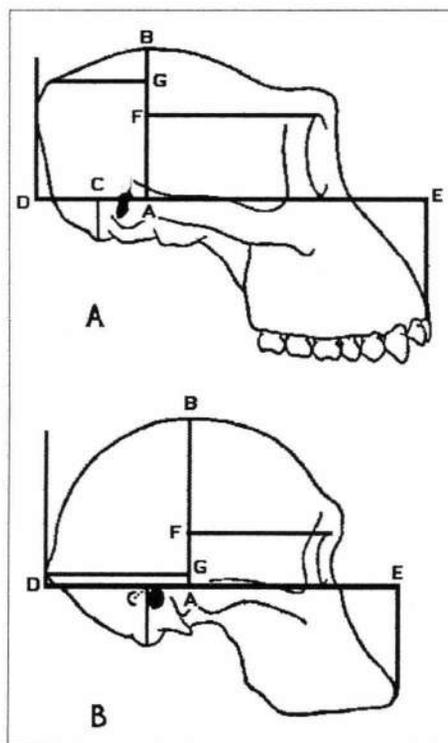
2.2.8 Indeks sebagai deskriptor bentuk

Upaya awal untuk membedakan bentuk mengarah pada pembuatan *ratio* yang sederhana. Seorang yang dapat dikatakan pertama-tama menggunakan ukuran-ukuran linear sebagai *ratio* atau indeks adalah Retzius. Untuk mengekspresikan bentuk dari tengkorak manusia pada orang hidup, Retzius memperkenalkan *index cephalica* atau *cranial index*. Indeks ini dimaksudkan sebagai ukuran umum dari bentuk kepala dalam *norma verticalis*.

Cephalic index, demikian juga indeks lainnya, telah digunakan secara luas di dalam dan bahkan di luar antropologi ragawi. Alasan-alasannya dapat dimengerti; indeks-indeks secara umum mudah dihitung dari ukuran-ukuran sederhana pada bahan baik hidup atau mati, dan menggambarkan ukuran dari bentuk secara sederhana. Sedikit banyak indeks adalah cikal bakal dari pendekatan menggunakan

multivariat karena mereka menggambarkan suatu usaha untuk mengkarakterisasi morfologi dengan dua atau lebih variabel secara serentak. Perluasan logis menjadi tiga variabel dapat dilihat dalam modul cranial yang didefinisikan sebagai panjang + lebar + tinggi (Martin, 1928).

Sementara indeks memegang peranan utama dalam analisis morfologi dari tengkorak manusia dan bahan-bahan *post cranial*, mereka juga telah digunakan untuk membuat perbandingan antara grup taksonomi. Sebagai contoh, Le Gros Clark mengusulkan tiga indeks yang berguna untuk membedakan grup taksonomi diantara ordo primata. Yaitu (1) Indeks *nuchal-area height*, (2) Indeks *Supra-orbital height* dan (3) Indeks *Condylar position* (Lestrel, 1974) (Lihat Gambar 2.9)



Gb 2.11 Sketsa dari A, Gorila betina dan B, Australopithecus Africanus pada norma lateralis. Indeks-indeks yang terlihat adalah : Indeks *Nuchal-Area Height* AG/AB ; Indeks *Supra-Orbital Height* FB/AB ; dan Indeks *Condylar-Position* CD/CE (Lestrel, 1974).

Ketiga indeks cranial ini telah digunakan untuk menunjukkan perkiraan perbedaan dari australopithecines dari pongids. Bahwa ketiga indeks ini tidak begitu baik dalam membedakan, terutama apabila grup taksonominya berhubungan sangat dekat.

Rosen dan McKern menunjukkan bahwa variabilitas dari indeks-indeks menyebabkan perbedaan diantara grup-grup sangat tidak jelas. Sebagai contoh, indeks Nuchal-Area Height dari Australopithecus Africanus = 8, Homo erectus = 56, Homo soloensis = 17, Tabun = 4, Rhodesian = 4, Kurdistan = 16, Orangutan = 56.

Kenyataan bahwa indeks *Nuchal-Area Height* dari orangutan dan Homo erectus adalah sama, menimbulkan pertanyaan yang serius tentang kegunaannya.

Contoh di atas dimaksudkan untuk menunjukkan secara sepintas bahwa **indeks-indeks adalah deskriptor bentuk yang jelek**. Indeks-indeks dibentuk dari ukuran-ukuran linear yang sebagian besar tergantung besaran (*size*), dan jelas bahwa antara dua titik tidak dapat digambarkan sesuatu yang prinsipil.

Kelemahan indeks ini dapat diatasi dengan analisis Fourier, yang dikembangkan oleh J.B.J. Fourier dalam rangka menghadapi problema mengenai penghantaran panas. Metode ini kemudian digunakan secara luas terutama di bidang fisika dan teknik, akhir-akhir ini juga di bidang geologi, geofisik, klimatologi, astrofisik dan biologi. Disamping Lu (1965), LESTREL (1975) menggunakan metode ini beberapa kali pada persoalan morfologi-anthropologis.

Kemajuan di bidang komputer yang makin cepat dan makin murah mendorong kita untuk melakukan pemeriksaan secara matematis yang menghasilkan peningkatan dalam akurasi dan kecepatannya. Untuk antropometri penggunaan komputer

umpamanya sangat membantu dalam melakukan analisa fungsi diskriminan. Kuantifikasi suatu bentuk yang tidak beraturan seperti bentuk lateral dahi dapat dikerjakan dengan menggunakan analisis Fourier yang sebelum adanya komputer sangat menyita waktu bila dikerjakan dengan tangan (Inoue,1992; Indrayana,1994).

2.2.9 Analisis Fourier

Secara tradisional, analisis Fourier sebagian besar terbatas penggunaannya hanya di bidang fisika dan tehnik. J.B.J.Fourier (1768-1830) yang mula mula merancang metode ini dalam hubungan dengan problema tertentu yang timbul dari menganalisis konduksi panas. Hasilnya adalah suatu rumus yang sejak itu kemudian penggunaannya berkembang meliputi bidang geologi, biologi, kedokteran dan fisika. Salah satu aplikasi utama analisis Fourier adalah untuk mendeteksi *periodicity* atau adanya suatu elemen yang berulang pada suatu set data.

Fourier series berguna untuk menyajikan suatu pengukuran yang akurat pada suatu bentuk tidak beraturan yang kompleks.

Analisis Fourier berdasar pada teori bahwa suatu gelombang yang tidak konsisten diuraikan sebagai gabungan dari fungsi trigonometri yaitu suatu gelombang *cyclic* secara terpisah yang diekspresikan sebagai suatu fungsi trigonometri.

Dengan menerapkan teori ini pada suatu bentuk kontur bagian tengkorak yang dianggap sebagai suatu gelombang *cyclic*, maka bentuk tidak beraturan ini dapat dikuantifikasi sebagai suatu fungsi trigonometri. Suatu garis kontur merupakan jumlah keseluruhan dari banyak titik.

Rumus dasar dari Seri Fourier adalah

$$y(\theta) = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i \cos i\theta + \sum_{i=1}^n b_i \sin i\theta$$

a_0 = konstanta

a_i = koefisien Fourier dari bagian Cosinus

b_i = koefisien Fourier dari bagian Sinus

θ = sudut, $0 < \theta < 2\pi$

i = angka suatu titik posisi dari Fungsi

n = jumlah titik posisi-posisi dari Fungsi

Sebelum memahami seri Fourier secara detail, perlu diketahui beberapa istilah, yaitu :

1. Period
2. Amplitudo
3. Harmonik

Suatu period adalah satu siklus sinusoidal yang lengkap dengan interval dari 0 sampai 2 phi. Dalam beberapa hal, suatu bentuk tidak beraturan seperti tengkorak manusia dapat diperlakukan sebagai elemen-elemen yang berulang pada interval dari 0 sampai 2 phi. Tinggi maksimum dari bentuk gelombang yang diukur dari sumbu X disebut amplitudo. Nilai ini sama dengan koefisien *Fourier* (a_1 dan b_1). Istilah harmonik menyatakan jumlah dari sinus dan cosinus.

2.2.10 Penggunaan Analisis Fourier

Analisis Fourier berguna sekali apabila bentuk-bentuk kompleks yang kontinu tak saja harus digambarkan secara tipologis melainkan juga secara kuantitatif. Dengan

demikian terbukalah kemungkinan menggambarkan bentuk, yang selama ini hanya didiskripsi secara morfognotis, dalam bentuk variabel-variabel yang kontinu sehingga penggunaan statistik korelasi dan serangkaian statistik yang multivarian seperti analisis Diskriminan .

Analisis *Elliptic Fourier*

Boundary representation menggunakan fungsi matematis yang menguraikan batas luar objek (biasanya suatu analisis harmonik seperti serial Fourier) dan digunakan untuk membandingkan objek-objek yang berbeda atau objek yang sama pada waktu yang berlainan. Untuk bentuk yang tertutup seperti bentuk mandibula, orbita dan neurocranium maka analisis *shape* dapat menggunakan rumus *elliptic Fourier* yaitu :

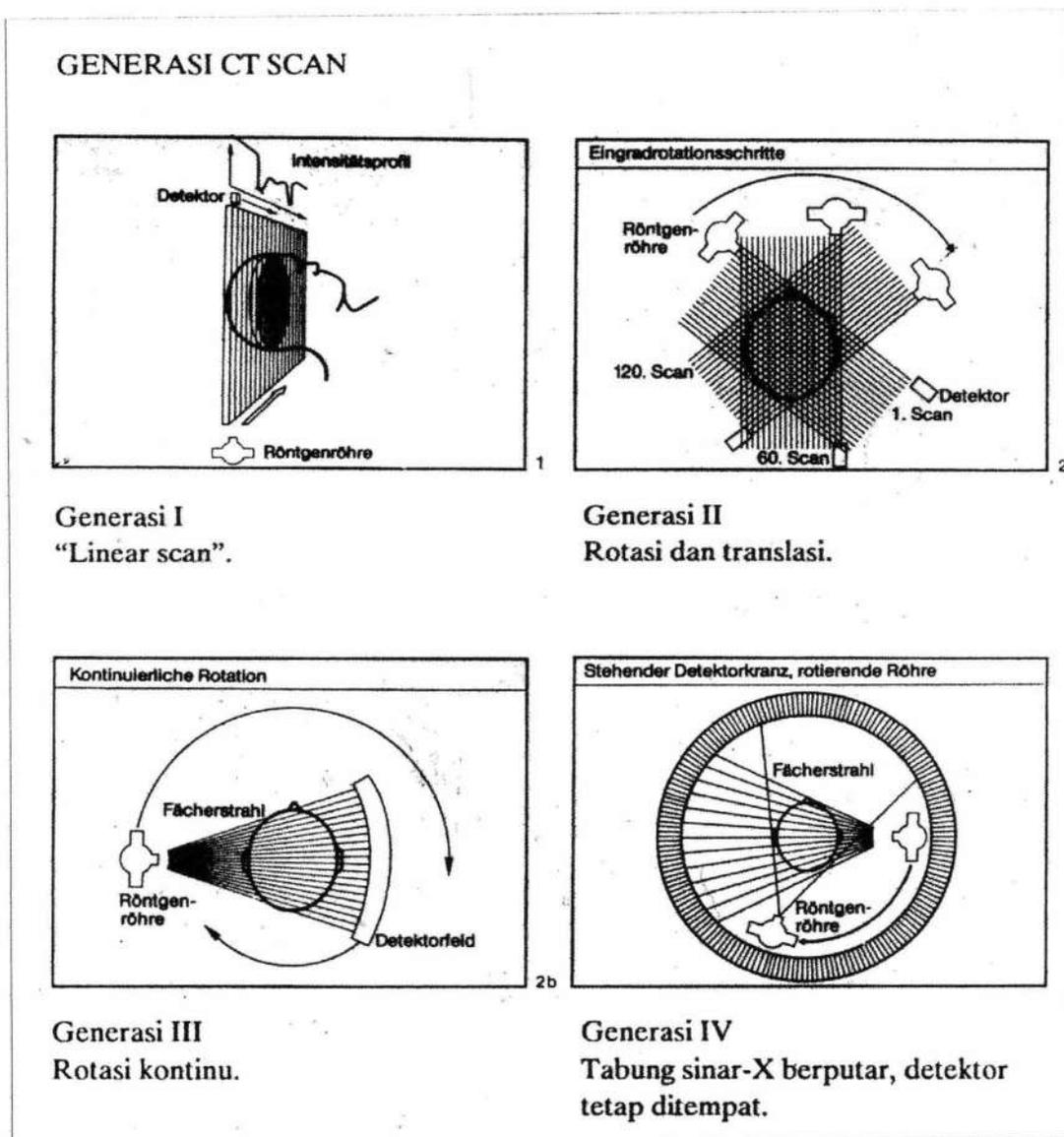
$$x(t) = A_0 + \sum_{n=1}^{20} \left(a_n \cos \frac{2n\pi t}{T} + b_n \sin \frac{2n\pi t}{T} \right)$$

$$y(t) = C_0 + \sum_{n=1}^{20} \left(c_n \cos \frac{2n\pi t}{T} + d_n \sin \frac{2n\pi t}{T} \right)$$

Serial Fourier klasik dan analisis elliptic Fourier telah banyak diterapkan untuk penelitian kuantitatif bentuk biologis dalam beberapa bidang ilmu : neurologi, kedokteran gigi, hematologi dan osteologi (Ferrario, 1996), namun masih belum banyak digunakan di bidang antropologi forensik bahkan belum pernah digunakan di Indonesia.

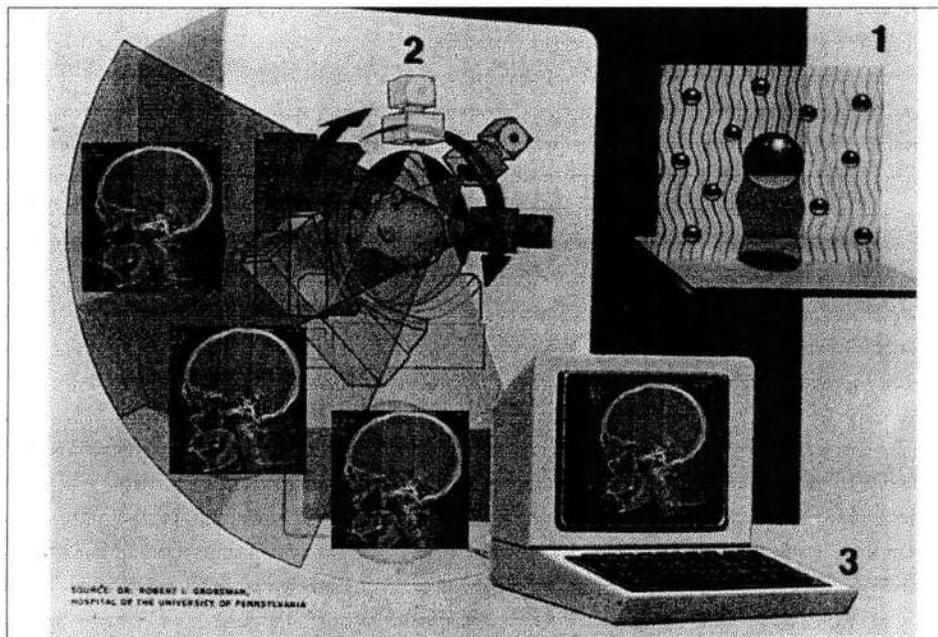
2.2.11 Tomografi komputer (Huwae, 1993)

Sejak ditemukan sinar X, dan diciptakannya pelbagai pesawat Rontgen, pesawat Tomografi Komputer, yang lebih dikenal dengan nama CT scan, merupakan pesawat Roentgen yang paling canggih sampai saat ini.



Gb 2.12 Generasi CT Scan

Prinsip-prinsip dari CT scan dikemukakan oleh Honsfield pada tahun 1968. Sinar X yang tipis membuat suatu irisan yang merupakan *scanning* dari bagian tubuh penderita. Intensitas dari sinar X yang keluar dari tubuh penderita diterima oleh suatu detektor yang seterusnya dioleh oleh sistem komputer dan oleh sistem komputer pula diadakan rekonstruksi yang terlihat sebagai gambar *image*. Dari tahun ke tahun terjadi perbaikan dan penyempurnaan, sehingga terjadi beberapa generasi dari pesawat CT Scan. Generasi pertama merupakan pesawat dengan sistem *scanning linear* dengan memakai hanya satu detektor. Generasi kedua lebih maju setingkat, dengan menggunakan beberapa detektor, dan telah mulai dengan langkah-langkah rotasi yang dikombinasikan dengan *linear*. Generasi ketiga memanfaatkan suatu *fan beam X-ray* dan menggunakan sekitar 500 detektor.



Gb 2.13 Dengan sinar X yang berbentuk kipas, CT Scan menghasilkan gambar penampang kepala (Huwae,1993)

Generasi keempat menggunakan sekitar 1000 detektor. Bila pada generasi pertama sampai ketiga tabung sinar-X dan detektor bergerak/berputar bersama-sama pada generasi keempat hanya tabung sinar-X yang berputar dan detektor tetap pada tempatnya. Dengan adanya berbagai macam generasi ini, tidak berarti bahwa pesawat CT yang baru adalah generasi keempat. Ada yang berpendapat bahwa lebih praktis dan lebih efisien generasi ketiga, sehingga pesawat—pesawat yang baru lebih banyak dari model generasi ketiga. Yang jelas dengan adanya generasi-generasi baru, maka waktu *scanning* akan diperpendek. Waktu *scanning* yang digunakan pada generasi pertama adalah beberapa menit untuk satu irisan, pada generasi kedua sebesar sekitar satu menit, dan pada generasi ketiga dan keempat hanya 2-3 detik untuk satu irisan. Dengan adanya tomografi komputer, banyak cara-cara pemeriksaan radiologi yang sebelumnya sering dikerjakan, waktu ini telah ditinggalkan. Terutama pemeriksaan diagnostik invasif, seperti penemosefalografi, ventrikulografi, dan berbagai macam pemeriksaan arteriografi tertentu, tidak pernah dikerjakan lagi. Waktu ini tomografi komputer masih terus dikembangkan sehingga mempunyai kemampuan yang jauh lebih besar dari generasi-generasi sebelumnya.