

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini bertujuan menentukan jenis kelamin tengkorak manusia dengan pendekatan yang terdiri dari dua konsep.

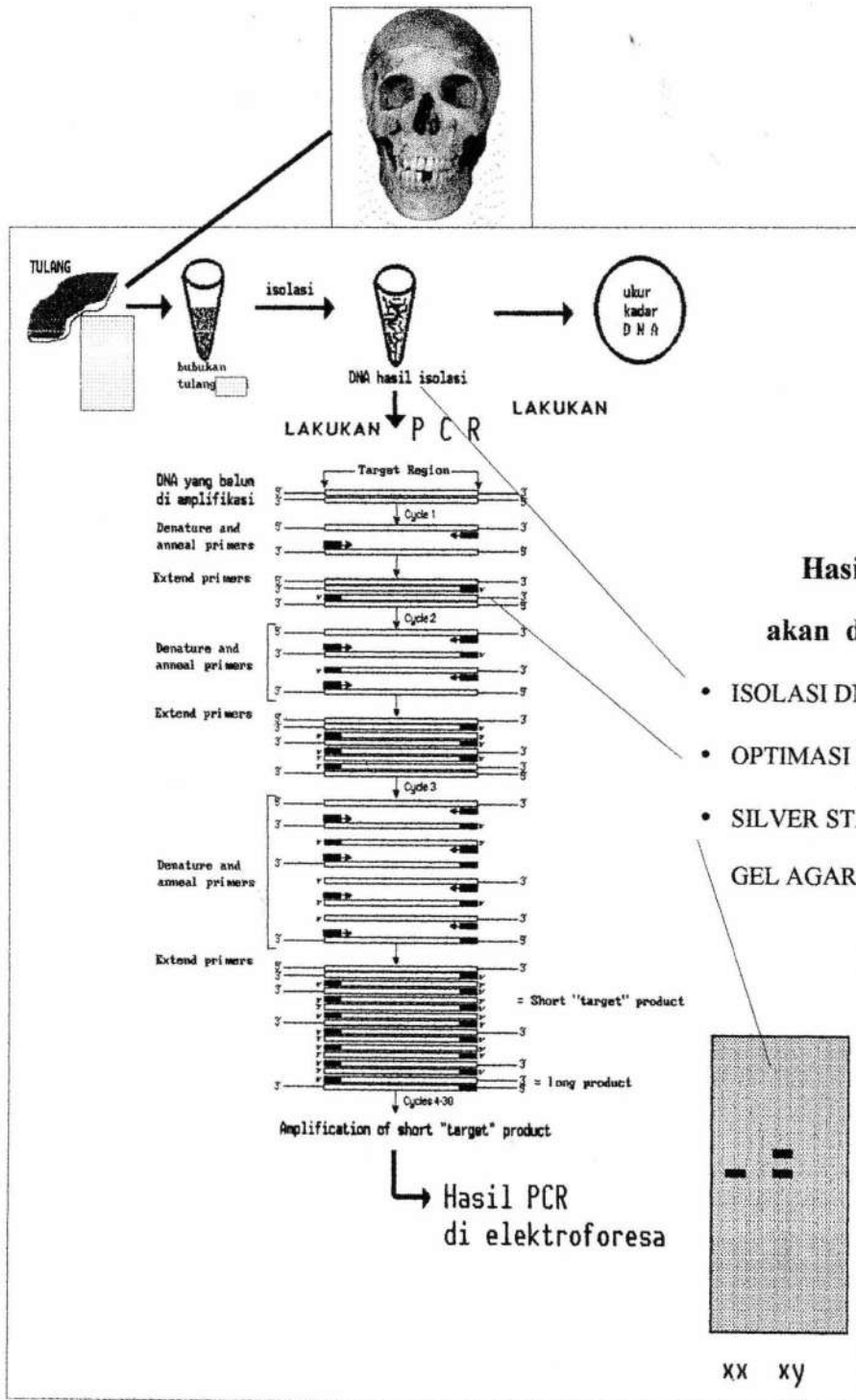
- a. **Konsep pertama** merupakan suatu penelitian **eksperimental laboratoris** untuk menentukan jenis kelamin tulang dengan analisis DNA.
- b. **Konsep kedua** merupakan suatu penelitian **observasional** dengan pendekatan *cross-sectional* untuk menentukan jenis kelamin dengan pendekatan morfometri tengkorak manusia dewasa. Penelitian ini menggunakan *digitizer* dan komputer sebagai alat ukur dan analisis *Fourier* dan *elliptic Fourier* untuk kuantifikasi bentuk.

#### 4.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium/Instalasi Ilmu Kedokteran Forensik Fakultas Kedokteran UNAIR/RSUD. Dr. Soetomo Surabaya dan Laboratorium Bersama "TROPICAL DISEASE CENTER".

Waktu Penelitian : dari Bulan Januari 1996 hingga Desember 1998.

4.3 Rancangan penelitian berkonsep biomolekuler



Gb. 4.1 Rancangan penelitian biomolekuler

### **4.3.1 Populasi, sampel, besar sampel dan teknik pengambilan sampel**

#### **4.3.1.1 Populasi penelitian**

Populasi penelitian adalah jenazah korban terlantar yang belum lama meninggal dunia, kerangka dari penggalian jenazah di Instalasi Ilmu Kedokteran Forensik RSUD Dr Soetomo, Surabaya.

#### **4.3.1.2 Sampel penelitian**

Sampel penelitian yaitu jaringan tulang yang didapat dari tengkorak populasi tersebut di atas yang akan diberi perlakuan

- (1) kelompok tulang didekalsifikasi hanya dengan larutan EDTA pada suhu kamar
- (2) kelompok tulang didekalsifikasi dengan EDTA dan dimasukkan dalam ultrasonik,
- (3) kelompok tulang didekalsifikasi dengan EDTA pada suhu, 56<sup>0</sup>C
- (4) kelompok tulang didekalsifikasi dengan EDTA pada suhu 56<sup>0</sup>C dan diultrasonik,
- (5) kelompok tulang berupa bubukan dengan cara pengeboran didekalsifikasi dalam EDTA pada suhu kamar,
- (6) kelompok tulang berupa bubukan dengan cara pengeboran didekalsifikasi dalam EDTA pada suhu kamar dan diultrasonik,
- (7) kelompok tulang yang berupa bubukan dengan cara pengeboran didekalsifikasi dalam EDTA pada suhu 56<sup>0</sup>C ,
- (8) kelompok tulang yang berupa bubukan dengan cara pengeboran didekalsifikasi dalam EDTA pada suhu 56<sup>0</sup>C dan diultrasonik.

#### 4.3.1.3 Besar sampel penelitian

Masing masing 10 potongan tulang untuk delapan jenis perlakuan (menurut tabel)

#### 4.3.2 Variabel penelitian

##### 4.3.2.1 Variabel bebas :

Variabel bebas meliputi tengkorak dari jenazah dengan jenis kelamin laki-laki dan perempuan

##### 4.3.2.2 Variabel terikat

Variabel terikat ialah variabel yang hendak diteliti, merupakan (1) lamanya waktu isolasi DNA tulang ; (2) hasil *silver staining* dan (3) DNA hasil PCR

#### 4.3.3 Bahan penelitian

EDTA 0.5 M, pH 7.5

Ammonium Oxalat jenuh pH 3.0

Deionized H<sub>2</sub>O

Reagen untuk isolasi DNA yaitu: guanidine thyocyanate, silica gel, tris HCL, Triton, X-100, DTT.

Pasangan Primer ( buatan GENSET - Singapore)

Primer 1 (Indrasex1) 5'-CTGATGGTTGGCCTCAAGCCTGTG-3'

Primer 2 (Indrasex2) 5'-TAAAGAGATTCATTAAGTTGACTG-3"

Taq polymerase beads berisi Taq , DNTP dan buffer (amersham)

Methanol 10%; Glycerol 2%; Ethanol 10%; Acetic acid 5%, AgNO<sub>3</sub> 0.1%

NaOH 1.5%; Formaldehyde 0.1%

Ethidium Bromide

Agarosa 1.3%

TBE 0.5X

#### **4.3.4 Alat penelitian**

Alat Bor - MAKITA hand drill

Untrasonic

Ultracentrifuge

Freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk menyimpan bahan

Mikropipet ependorf, 0-10 ul; 10-100 uL; 100 - 1000 uL

Micro balance 0 - 100 mgram; Libror EB 3200D

Transilluminator UV 203 beserta Polaroid photo set

*Back illumination white lamp* - buatan sendiri

#### **4.3.5 Prosedur pengambilan atau pengumpulan sampel DNA tulang.**

##### **4.3.5.1 Dekalsifikasi, Isolasi dan Kuantifikasi DNA**

Dekalsifikasi dilakukan dengan 8 cara (lihat 4.1.2.2) Dekalsifikasi menggunakan 40 cc 0.5 EDTA, pH 7,5. Pada tulang yang tidak dijadikan bubuk dan tidak di inkubasi dalam sonikator tabung berisi tulang dikocok dengan rotor pada  $4^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam, kemudian dipusingkan pada 2000 g selama 15 menit. Supernatnya dibuang, kemudian ditambahkan 40 cc larutan dekalifikasi dan proses diulang. Umumnya dekalifikasi memakan waktu 3 -5 hari. Proses dekalifikasi dimonitor dengan pemberian larutan amonium oksalat jenuh pada pH 3,0. Apabila larutan tetap jernih sesudah ditambah amonium oksalat, proses dekalifikasi dihentikan. Catat berapa waktu yang diperlukan. Kemudian pellet dicuci dengan 40 cc *deionized H<sub>2</sub>O* steril, dikocok selama beberapa menit kemudian sampel dipusingkan pada 2000 g selama 15 menit dan supernatnya

dibuang. Proses ini, yang membuang akumulasi ion sesudah dekalsifikasi, diulang 3 kali.

DNA diisolasi dengan reagen *Ready Amp* dari PROMEGA.

Jumlah dan kemurnian dari DNA yang dihasilkan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280 nm dan *dip stick* untuk mengukur kadar DNA yang dihasilkan sebelum dilakukan amplifikasi PCR.

#### **4.3.5.2 Penelitian *silver staining* pada gel agarosa**

Untuk mencari metoda *silver staining* pada gel agarosa dilakukan penelitian dengan memberi perlakuan pada gel agarosa yaitu:

- (A). Gel agarosa tidak dilakukan *drying*,
- (B). Gel agarosa *didrying* dengan gliserol,
- (C). *developing* pada suhu kamar,
- (D). *developing* pada suhu 8-10°C

#### **4.3.5.3 Optimasi dan teknik PCR**

Dilakukan PCR dengan primer *indrasex1* dan *indrasex2* terhadap DNA hasil isolasi dengan protokol:

- a). 95°C selama 4 menit untuk denaturasi, diikuti dengan
- b). 95°C selama 1 menit,
- c). 58°C selama 1 menit,
- d). 72°C selama 2 menit

tahap b, c, d secara berturutan sebanyak 35 siklus.

#### 4.3.6 Analisis data

Hasil penelitian (1) dekalsifikasi tulang untuk isolasi DNA, (2) pengaruh pengeringan dan suhu pada *silver staining* dan (3) hasil PCR untuk penentuan jenis kelamin di tabulasi dan dianalisis dengan *Chi-Square*.

#### 4.4 Rancangan Penelitian ANTROPOLOGI RAGAWI

##### 4.4.1 Populasi, sampel, besar sampel dan teknik pengambilan sampel

###### 4.4.1.1 Populasi penelitian

Populasi penelitian berupa foto CT Scan lateral kepala yang dibuat di UPF Radiologi dari orang Indonesia dewasa (umur > 20 th) di Surabaya dengan kriteria: (!) tanpa kelainan kongenital kepala berdasarkan hasil pemeriksaan ahli radiologi dan neurologi,(2) tanpa kerusakan struktur tengkorak

###### 4.4.1.2 Jumlah sampel yang digunakan ialah 100 foto CT Scan Lateral tengkorak

Estimasi jumlah sampel:

Untuk menghitung jumlah sampel maka pada penelitian ini digunakan rumus penelitian observasional dengan populasi (N) tidak diketahui (Pudjihardjo,1993):

$$\text{Rumus } n = \frac{[Z_{\alpha} \sqrt{2P(1-P)} + Z_{\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)}]^2}{(p_1-p_2)^2}$$

dimana :  $Z_{\alpha} 0,05 = 1,96$ ;  $p_1 = 0,45$

$Z_{\beta} 0,10 = 1,28$ ;  $p_2 = 0,08$

$p = 0,116$ , nilai  $p_1$  dan  $p_2$  menurut penelitian Soehardjo (1994)

Hasil perhitungan  $n = 25$

##### 4.4.2 Identifikasi variabel penelitian

Ada 2 macam variabel dalam penelitian ini, yaitu variabel bebas dan variabel tergantung.

a. Variabel bebas : Jenis kelamin laki-laki dan jenis kelamin perempuan



b. Variabel tergantung :

Sebagai variabel tergantung ialah nilai nilai *normalized harmonic amplitudo* yang dihasilkan dari perhitungan analisis *Fourier* dari kontur bentuk *cranium* dan analisis *elliptic Fourier* untuk bentuk lingkaran tertutup (*neurocranium* dan *mandibula*). Untuk masing masing bentuk ada 16 variabel nilai harmonik amplitudo yaitu D1 hingga D16 dan 80 variabel koefisien *elliptic harmonic*.

4 kontur bentuk yang diteliti ialah:

1. bentuk dahi
2. bentuk *neurocranium*
3. bentuk belakang kepala
4. bentuk *mandibula*

Kontur bentuk yang diteliti dibatasi oleh titik titik antropometris :

**Titik Kranimetris yang paling penting. Huruf dalam kurung adalah simbol titik tertentu menurut Martin (1957).**

**Glabella (g)** titik paling depan pada tulang dahi, terletak di antara tonjolan supraorbital pada Bidang Median-Sagittal.

**Bregma (b)** titik yang terletak pada tempat pertemuan antara sutura coronalis dan sutura sagittalis.

**Lambda (l)** titik pada pertemuan sutura sagittalis dan sutura lamdoidea.

**Inion (i)** titik di tempat Bidang Median-Sagittal memotong linea nuchae superior.

**Opistion (o)** titik di tempat Bidang Median-Sagittal memotong lubang besar tulang kepala-belakang (foramen occipitale magnum) sebelah belakang.

**Vertex (v)** titik tertinggi pada *neurocranium* dalam posisi pada Dataran Frankfort.

**Mastoidale (ms)** titik paling bawah dan paling lateral pada ujung processus mastoideus (tajak berbentuk puting).

**Nasion (n)** titik tempat Bidang Median-Sagittal memotong jahitan antara tulang dahi dengan tulang-tulang hidung (sutura fronto-nasalis).

**Nasospinale (ns)** titik pemotongan antara Bidang Median-Sagittal dengan tajuk duri hidung (spina nasalis anterior) atau pada garis, yang menghubungkan pinggir paling bawah rongga hidung (apertura piriformis), khususnya kalau spina nasalis anterior kurang kentara.

**Orbitale (or)** titik paling bawah pada lekuk mata (orbita). Tempat Dataran Frankfurt berlalu (bukan titik ukuran).

**Gnathion (gn)** titik paling bawah pada rahang bawah (mandibula) yang dipotong oleh Bidang Median-Sagittal.

**Gonion (go)** titik paling bawah, posterior dan lateral pada sudut yang terbentuk oleh cabang (ramus) dan badan rahang bawah (corpus mandibulae).

**Infradentale (id)** titik tempat Bidang Median-Sagittal memotong pinggir atas processus alveolaris mandibulae (di antara dua gigi seri pertama pada rahang bawah).

**Kondylion laterale (kdl)** titik paling lateral processus condylaris.

**Kondylion mediale (kdm)** titik paling medial processus condylaris.

#### **4.5. Definisi Operasionil Variabel**

Yang dimaksud dengan kerangka ialah kerangka manusia dewasa populasi penduduk di Surabaya.

Yang dimaksud dengan tengkorak ialah tengkorak dari manusia dewasa tanpa kelainan bawaan dari populasi penduduk surabaya.

#### 4.6. Alat Ukur

Perangkat keras

##### 4.6.1. Graphic Digitizer "Sketchmaster" GTCO model LCD-1211

Data teknis : Interface : RS232C ; Baud rate : 9600 baud

Asynchronous framing : 8 data bits, 1 stop bit, odd parity

Operating environment : 10 - 40 °C; Switched stream digitizing mode

output rate : 60 titik per detik

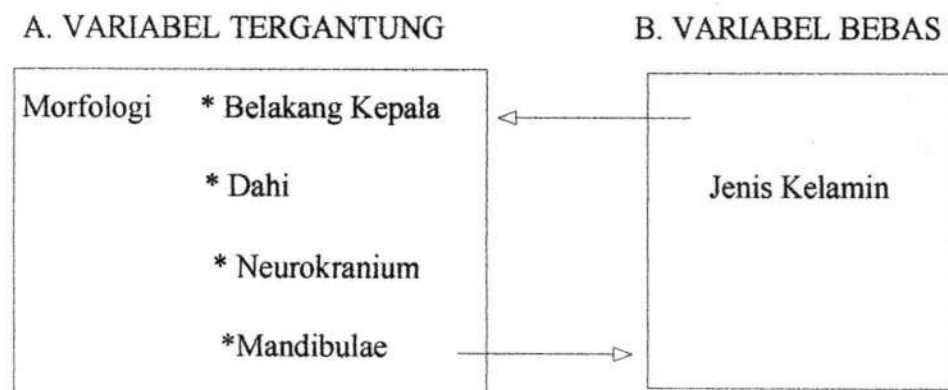
format binary, resolusi 0.002 " (500 per inch)

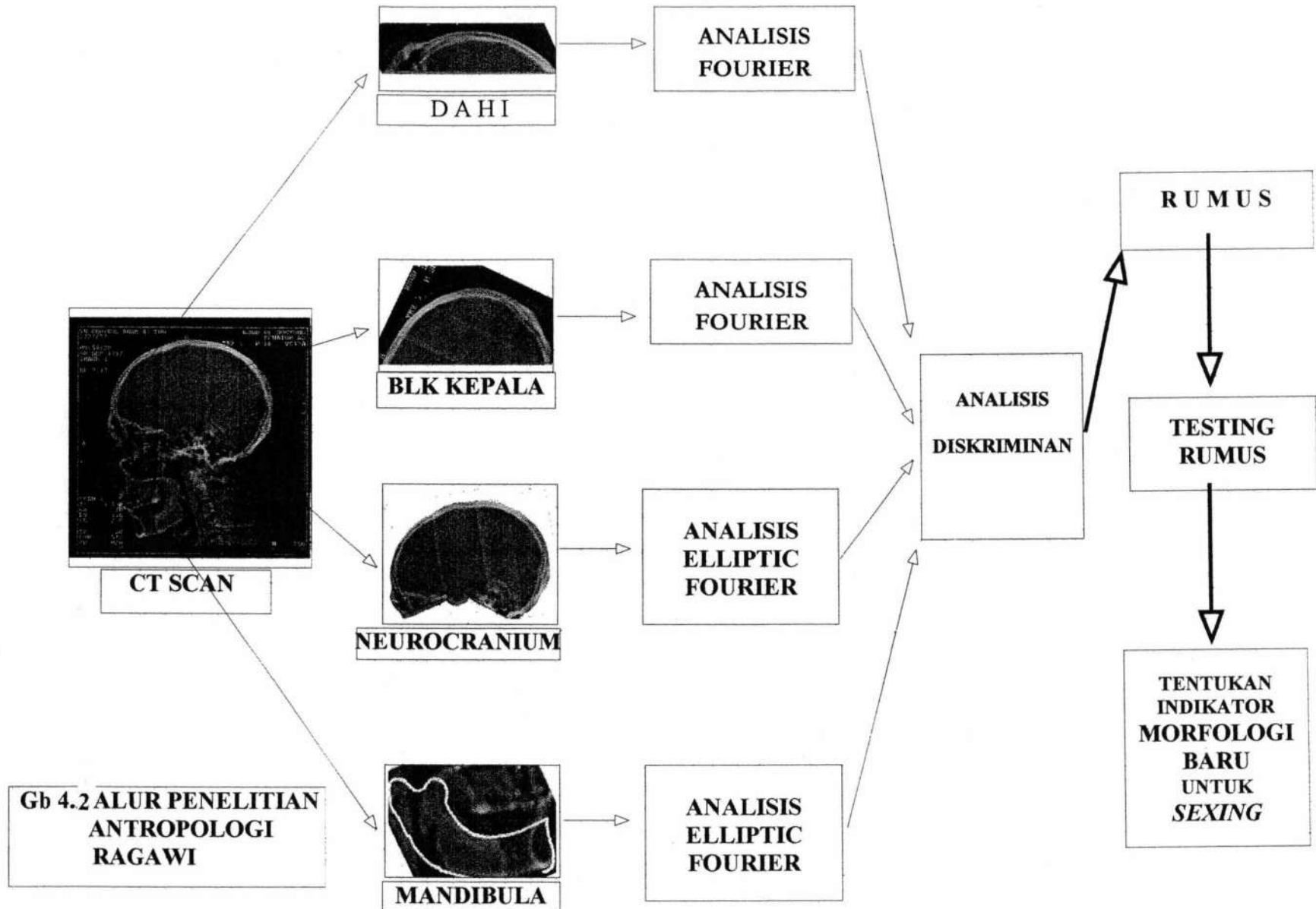
##### 4.6.2. PC AT 486 Computer dengan suatu RS232C serial port

#### Perangkat lunak :

Program Komputer dalam BASIC rancangan peneliti sendiri untuk *tracing* foto Rontgen tengkorak dengan digitizer, kemudian menghitung nilai *normalized harmonic amplitudes* dan Program Komputer dalam BASIC untuk *tracing* foto rontgen tengkorak lateral dengan digitizer, menghitung nilai *normalized harmonic amplitudes* dan menentukan jenis kelamin tengkorak tersebut.

#### 4.7 Alur Penelitian





Gb 4.2 ALUR PENELITIAN ANTROPOLOGI RAGAWI

#### 4.8. Pelaksanaan Penelitian

##### Tahap I :

Menentukan nilai fungsi diskriminan dengan analisis Fourier dari kontur belakang kepala dan bentuk dahi, dan analisis elliptic Fourier untuk kontur *neurocranium* dan mandibula

Foto CT Scan lateral kepala dibuat garis *lateral contour* nya kemudian di *tracing* dengan sebuah digitizer komputer (Sketchmaster). Dengan sebuah program komputer yang ditulis dalam bahasa BASIC (GWBASIC) nilai titik-titik koordinat dari garis *contour* bentuk-bentuk tersebut secara serial dimasukkan dalam komputer yang kemudian akan menghitung nilai sumbu X dan sumbu Y.

Bentuk-bentuk tersebut di kuantifikasi dengan metoda analisis Fourier (Price, 1985; Ramirez, 1985; Inoue M., 1990), yang dalam penelitian ini kontur bentuk tersebut dibagi menjadi 32 interval sama besar sehingga didapatkan 32 titik ( $X_0, Y_0$ ) sampai ( $X_{31}, Y_{31}$ ). Dengan analisis Fourier didapatkan nilai *harmonic amplitudes* ( $C_1 - C_{16}$ ). Untuk menghilangkan faktor "size" nya dalam menganalisa bentuk, maka nilai-nilai ini dibagi dengan  $A_0$  yaitu nilai rata-rata dari Y, sehingga didapatkan nilai nilai *normalized harmonic amplitudes* ( $D_1 - D_{16}$ ).

Dari nilai-nilai *normalized harmonic amplitudo* tadi sebagai dependen variabel dan Jenis kelamin sebagai independen variabel dihitung nilai fungsi diskriminannya dengan menggunakan program SPSS.

**Tahap 1 b.** Pembuatan program untuk penentuan jenis kelamin dan diuji efektifitasnya.

Menggunakan analisis Fourier dan fungsi diskriminan yang dihasilkan pada Tahap 1, dirancang suatu program *Otomatisasi Sexing* yang menggunakan Digitizer "Sketchmaster" dan komputer IBM PC AT 286 dalam bahasa BASIC (Yudhistyra E., 1987; Sutrisno Hadi, 1991)

Untuk menguji efektifitas fungsi diskriminan ini dipakai 50 foto Rontgen CT Scan lateral.

Foto lateral ini di *tracing* dengan cara yang sama seperti pada Tahap 1. Hasil nilai *normalized harmonic amplitudes* nya (C<sub>1</sub> - C<sub>16</sub>) kemudian dimasukkan dalam fungsi diskriminan hasil penelitian tahap I dan menghasilkan suatu nilai (*Discriminant function score*) yang dipakai untuk penilaian jenis kelamin. Proses ini dikerjakan secara otomatis dengan program yang telah dirancang tersebut diatas.

#### **4.9. Analisis statistik**

Data dianalisis dengan menggunakan teknik statistik inferensial untuk menguji hipotesis nihil.

Untuk mengetahui berbagai morfologi bagian tengkorak yang dapat bertindak sebagai deskriminator terhadap jenis kelamin digunakan Analisis Diskriminan.