

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini ditujukan untuk menentukan jenis kelamin tengkorak baik secara biomolekuler maupun secara antropologi ragawi. Meningkatnya kualitas kejahatan terutama pembunuhan, perkosaan, juga kecelakaan massal dengan akibat derajat kerusakan tubuh yang parah akan mempertinggi kesulitan dalam identifikasi forensik. Untuk mengungkap identitas korban, tahap pertama yang paling penting adalah menentukan jenis kelamin korban tersebut.

Tahap dan jenis penelitian ini ada dua macam yaitu

1. Tahap penelitian biomolekuler yang merupakan penelitian eksperimental laboratoris untuk menentukan jenis kelamin melalui penggandaan suatu lokus homolog pada kromosom seks dan
2. Tahap penelitian antropologi ragawi suatu penelitian *observasional cross sectional* untuk menentukan jenis kelamin berdasarkan kuantifikasi morfometri bentuk kepala dengan *analisis Fourier* dan *analisis elliptical Fourier*

Penelitian biomolekuler

Penentuan jenis kelamin tengkorak secara biomolekuler ditempuh bila tengkorak sudah hancur atau bentuknya sudah tidak dapat dirangkai lagi. Pendekatan ini dapat dilakukan dengan menggunakan *probe* atau dengan *PCR*.

Penggunaan *probe* membutuhkan jumlah DNA dengan berat molekul tinggi yang cukup banyak. Pada kasus forensik sering barang bukti hanya sedikit atau sudah mengalami degradasi, sehingga satu satunya cara yang masih bisa ditempuh ialah dengan menggandakan DNA sampel dengan *PCR*.

Proses *PCR* memerlukan 3 tahap yaitu

- 1) isolasi DNA,
- 2) Disain primer,
- 3) visualisasi hasil *PCR* dengan elektroforesis kemudian dilakukan pewarnaan untuk menentukan panjang pita DNA.

Tahap isolasi DNA tulang dan gigi

Untuk mengisolasi DNA tulang maka inti sel tulang yang dikelilingi oleh matriks tulang yang terdiri dari garam anorganik yaitu crystal *hydroxyapatite* yang keras harus dipecahkan dahulu dengan harapan DNA dapat diisolasi dan hasil isolasinya digandakan dengan metode *PCR* untuk penentuan jenis kelamin.

Pada penelitian ini peneliti telah berhasil mengembangkan cara untuk melakukan isolasi DNA tulang dan gigi dengan menggunakan alat sonikator dan alat bor untuk mempercepat isolasi DNA tulang dan gigi. Untuk itu maka tulang dijadikan bubuk dahulu dengan dibor dengan alat yang mempunyai kecepatan 2000 rpm dan disonifikasi dengan alat sonikator dengan frekuensi 33.000 Hz, sedangkan supaya suhu stabil digunakan *water bath* yang dioperasikan pada suhu 56⁰ C. Delapan kelompok perlakuan yang masing-masing terdiri dari 5 macam sampel yaitu tulang segar, tulang dari korban yang membusuk, tulang yang terendam dalam air, tulang tertanam dalam tanah dan gigi. Kedelapan kelompok perlakuan tersebut yaitu (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 56⁰ C, (4) kelompok tulang didekalsifikasi dengan EDTA pada suhu 56⁰ C dan diultrasonik, (5) kelompok tulang berupa bubuk dengan cara pengeboran didekalsifikasi dalam EDTA pada suhu kamar, (6) kelompok tulang berupa bubuk 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 °C , (8) kelompok tulang yang berupa bubukan dengan cara pengeboran didekalsifikasi dalam EDTA pada suhu 56 °C dan diultrasonik.

DNA dapat diisolasi dari semua sampel tulang. Jumlah DNA yang dihasilkan ditentukan dengan menggunakan *DNA DipStick Kit* dari INVITRO GEN dengan hasil berentang dari 10ng/uL untuk tulang kontrol dan 5 ng - 10 ng/uL untuk sampel tulang yang diteliti. Sesuai dengan perhitungan, di mana jumlah osteocyt dalam tulang adalah sekitar 20.000-26.000 per mm³ (Hochmeister,1991) maka dengan prosedur yang efektif (*powdering* dan isolasi), DNA secara potensial dapat diekstraksi dari satu gram tulang. Jadi meskipun dari korban yang telah membusuk sekalipun, sampel DNA masih dapat dianalisis, setidaknya dengan analisis PCR.

Ternyata metoda yang paling baik ialah tulang dijadikan bubukan dengan pengeboran kemudian dilakukan sonifikasi pada suhu 56 °C (lihat tabel 5.1) Keuntungan isolasi dengan teknik ini adalah sampel tulang dan gigi tidak perlu dihancurkan sama sekali. **Keunggulan metoda temuan peneliti** ini ialah waktu untuk proses isolasi termasuk dekalsifikasi hanya **4-5 jam** sedangkan metoda yang telah ada menggunakan nitrogen cair dan blender yang mahal (Hochmeister, 1994) memerlukan **5-6 hari** dan metode *Nuts and Bolts* yang dikembangkan oleh Thomas (1997) masih memerlukan waktu **2-3 hari**.

Jadi dengan demikian dengan pengeboran dan sonifikasi tulang terbukti mempercepat isolasi DNA tulang (hipotesis 3.2.1 terbukti)

Tahapan desain primer

Untuk merancang suatu primer yang dapat membedakan jenis kelamin seyogyanya lokus yang digandakan terdapat pada *gen homolog sex chromosome* karena hal ini memungkinkan suatu kontrol internal. Pada penelitian ini dirancang sepasang primer yang akan menggandakan suatu lokus pada gen amelogenin suatu gen homolog yang terdapat pada rantai pendek kromosom X dan Y. Dengan menggunakan perangkat lunak dapat dirancang sepasang primer berdasarkan urutan gen amelogenin yang sudah dipetakan dan dapat diakses melalui gen bank. (lihat lampiran 5)

Adanya perbedaan pada intron gen amelogenin yang terdapat dalam kromosom seks laki-laki dan perempuan memungkinkan perbedaan ini dapat dimanfaatkan untuk penentuan jenis kelamin melalui penggandaan (PCR) lokus tersebut.

Urutan pasangan primer yaitu :

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

Primer 2 (Indrasex2) 5'-TAAAGAGATTCATTAACCTTGACTG-3'

Primer yang ada (komersial primer PROMEGA) menghasilkan produk PCR 212 bp X-spesifik dan 218 bp Y-spesifik sebagai akibat adanya dilesi 6 bp pada intron pertama dari X homolog. Hal ini menyulitkan visualisasi karena untuk separasi DNA sebesar 6 bp memerlukan gel khusus (polyacrylamide 6%) dengan fluoresensi khusus.

Optimasi PCR untuk pasangan primer yang dirancang ialah:

1. 96 ° C selama 3 menit - tahap denaturasi kemudian dilanjutkan dengan
2. 95 ° C selama 1 menit,
3. 58 ° C selama 1 menit untuk *annealing* dan
4. 72 ° C selama 2,5 menit untuk *extention*.

PCR dilakukan sebanyak 35 siklus untuk optimasi tersebut.

Hasil PCR dengan primer ini terbukti lebih unggul dibandingkan dengan primer komersial karena menghasilkan perbedaan pita antara X-spesifik dan Y-spesifik sebesar 189 bp. (lihat tabel 5.4) Keuntungan lain elektroforesis untuk visualisasi dapat dilakukan pada gel agarosa biasa yang tidak berbahaya dibandingkan polyacrylamide yang merupakan suatu bahan yang neurotoksik. (lihat Gb. 5.1 dan Gb. 5.2)

Dengan demikian terbukti hipotesis 3.2.2 bahwa pasangan primer rancangan peneliti menghasilkan pada jenis kelamin laki dua pita DNA (788 bp dan 977 bp) yang dapat diseparasi pada gel agarosa 1,3% dengan *silver staining*. Pada penelitian ini ternyata tahap yang paling menentukan pada PCR yaitu optimasi PCR karena dengan adanya sedikit perubahan saja akan menggagalkan proses PCR. Salah satu penyebab adalah kesalahan dan ketidaktepatan dalam hal pengambilan jumlah bahan PCR (primer, taq, MgCl₂, buffer) yang memerlukan ketelitian dan ketrampilan.

Tahap ketiga PCR yaitu visualisasi pita DNA

Penelitian pewarnaan DNA pada gel agarosa dengan teknik '*silver staining*'

Pewarnaan biasanya menggunakan *ethidium bromide* suatu bahan karsinogenik. Ini dapat dihindari dengan *silver staining* namun kendalanya protokol yang ada tidak dapat digunakan untuk gel agarosa sebab menimbulkan latar belakang yang kotor. Sampai sekarang *DNA silver staining* pada agarosa tidak dianjurkan meskipun sensitivitasnya lebih tinggi dibanding pengecatan dengan *ethidium bromide*, karena menimbulkan *background* yang hitam akibat struktur agarosa memungkinkan kondisi untuk penumpukan ion perak (Peats, 1984; Gottlieb, 1987).

Penyebab kekotoran *background* ialah adanya kandungan S dan kadar air yang tinggi dibanding *polyacrylamide*. Dengan mempelajari perilaku perubahan pada kadar 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. (lihat tabel 5.6)

Rancangan **protokol yang dikembangkan oleh peneliti** yaitu: (1) Tahap pengeringan - dalam methanol dan gliserol 2% selama 10 menit, (2) tahap fiksasi - ethanol 10%, acetic acid 5% selama 5 menit, (3) tahap *staining*- perak nitrat 0,1% selama 15 menit, (4) tahap *developing* NaOH 1,5%, *formaldehyde* 0,1% merupakan modifikasi dari protokol silver staining untuk polyacrylamide berupa **penambahan tahap pengeringan** dengan menggunakan **methanol dan gliserol** untuk mengurangi kadar air. Penurunan kadar air agarosa ini mengakibatkan hambatan untuk penumpukan ion Ag pada agarosa. Kadar *glacial acetic acid* juga ditingkatkan dari 0,5% menjadi 5%, dengan tujuan menghasilkan pengurangan kadar air gel agarosa dan menghambat reaksi ion S dengan Ag sehingga tidak terjadi penumpukan AgS yang menyebabkan kekotoran *background*. Kekotoran background juga dapat dihindari dengan memperlambat reaksi pada tahap *developing*, yaitu dengan melakukan *developing* pada suhu 8-10⁰ C. Hal ini mengakibatkan terhambatnya penumpukan ion Ag pada permukaan agarosa sehingga mengurangi kekotoran pada latar belakang gambaran *silver staining*.

Dengan demikian terbukti hipotesis 3.2.3 bahwa hasil *silver staining* pada gel agarosa yang dikeringkan menggunakan gliserol disertai *developing* pada suhu dingin memperjelas gambaran pita DNA. (lihat tabel 5.3 Hasil uji Chi-Square ; $p=0.000$)

Hasil *PCR* dengan primer ini terbukti lebih unggul dibandingkan dengan primer komersial karena menghasilkan perbedaan pita antara X-spesifik dan Y-spesifik sebesar 189 bp. Keuntungan lain elektroforesis untuk visualisasi dapat

dilakukan pada gel agarosa biasa yang tidak berbahaya dibandingkan *polyacrylamide* yang merupakan suatu bahan yang neurotoksik. (lihat Gb. 5.1 dan Gb. 5.2))

Untuk memudahkan pembuatan gel agarosa yang tipis supaya kadar airnya sedikit dan memudahkan *loading* sampel, maka peneliti telah berhasil juga men desain suatu alat electrophoresis *horizontal discontinue type*. Tebalnya agarosa bisa diatur setebal 1 mm, 2mm atau 3 mm tergantung tebal *spacernya*.

Pembahasan Bidang Antropologi Ragawi

Penelitian di bidang antropologi ragawi menggunakan cephalogram lateral Kepala dan CTScan kepala karena cara tersebut memungkinkan melihat profil tengkorak secara cepat tanpa harus mengkuliti tulang tengkorak dan menurut penelitian yang terdahulu perkembangan craniofacial lebih besar ke arah vertikal sagital - anteroposterior dibandingkan ke arah fronto transversal.

Pertumbuhan craniofacial pada perempuan terhenti pada umur sekitar 17-19 tahun akibat perempuan lebih cepat mencapai masa pubertas yang pada umur 13 tahun pertumbuhan mulai lambat, sedangkan pada laki-laki umur 15 tahun mulai lambat dan bahkan masih berkembang sampai sesudah umur 20-an, keadaan ini akibat pengaruh hormon esterogen (Frank,1995).

Penentuan jenis kelamin dengan pendekatan antropologi ragawi dilakukan dengan mengukur bentuk tulang belakang kepala, dahi, *neurocranium* dan *mandibulae*. Untuk menghilangkan faktor size maka gambaran cephalogram sampel laki dan perempuan diskala dan diletakkan pada posisi horizontal dengan menggunakan perangkat lunak *ADOBE PHOTOSHOP* , sedangkan analisis bentuk dilakukan dengan menggunakan analisis *Fourier* dan analisis *elliptic Fourier*., kemudian hasil diolah dengan komputer menggunakan perangkat lunak SPSS

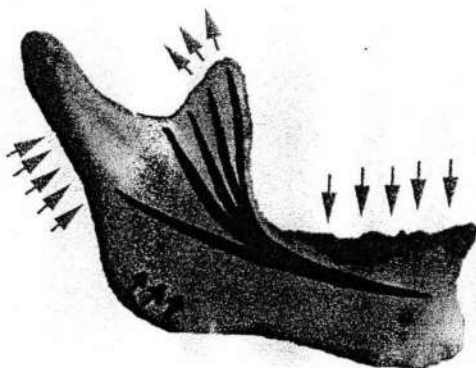
Penentuan jenis kelamin tengkorak secara morfometrik (kuantitatif) dengan fungsi diskriminan sebagian besar didasarkan pada jarak antara titik-titik antropometris tengkorak. (Lestrel, 1974, Johnson, 1989, Hong Wei Song, 1992). Informasi yang didapat dari teknik ini cukup untuk memprediksi besar *size* tengkorak, tetapi tidak bentuk *shape* nya. Suatu tengkorak dengan ciri suatu tengkorak laki-laki seperti daerah supraorbital yang menonjol, *processus mastoideus* yang besar, tetapi ukuran tengkoraknya kecil dapat diklasifikasi sebagai perempuan bila digunakan *distance based discriminant function* (Inoue,

1990). Perbedaan jenis kelamin pada tengkorak lebih baik dituangkan dalam *shape* dibandingkan dalam *size* (Lestrel,1974), tetapi cara konvensional dengan pengamatan bentuk adalah subjektif dan ketepatannya sangat tergantung pada pengalaman pemeriksanya. Steward (1948) melakukan *sexing* mandibula dengan ketepatan hanya 77%.

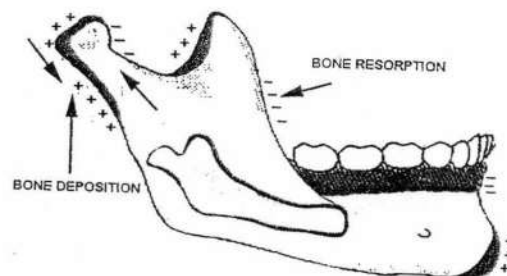
Hasil penelitian kontur bentuk lateral mandibula menggunakan analisis *elliptic Fourier* dapat mengklasifikasi jenis kelamin dengan ketepatan 100 %, pada 57 sampel mandibula orang sehat di atas umur 20 tahun. (lihat tabel 5.14)

Pada *mandibula*, nilai diskriminan antara laki-laki dan perempuan sangat tinggi (100%) disebabkan beberapa hal antara lain :

(1). kontraksi otot pengunyah menghasilkan peregangan pada bagian luar fibros yang menutupi kepala, sebaliknya tulang mengalami kompresi pada saat gigi oklusi. Pada mandibula gaya timbul akibat otot mastikasi yang meneruskan gaya ke gigi melalui '*cantilever*' *corpus mandibulae*. Keadaan ini menghasilkan gaya pembengkokan pada tulang yang diaplikasi pada *processus coronoideus* dan garis aksinya melengkung secara inferoanterior di bawah *processus alveolaris* (Thurow,1970). Dengan menggunakan analisis '*finite element*' yang pernah dilakukan oleh peneliti (Indrayana,1998) dapat ditunjukkan bahwa gaya ini menentukan bentuk mandibula;



Gb. 6.1 Gaya yang bekerja pada mandibula pada saat mengunyah



Gb. 6.2 Deposisi dan resorpsi tulang selama pertumbuhan mandibula

(2) selama pertumbuhan dan perkembangan *mandibula* tulang dibentuk pada condylus sehingga menyebabkan pertumbuhan ramus ke arah superoposterior yang juga disertai dengan deposisi pada permukaan dorsal bagian superior *ramus* (Sperber,1989). Selama masa pubertas, esterogen mempengaruhi maturasi epifise dan mineralisasi (Frank,1995), dengan demikian menstabilkan bentuk *mandibula* seorang perempuan sekitar 17-19 tahun, sedangkan pada laki-laki tetap berlangsung terus sampai 2 tahun berikutnya. Hal ini membuat perbedaan bentuk *mandibula* yang lebih nyata antara laki-laki dan perempuan.

Penentuan jenis kelamin dengan analisis *elliptical Fourier* terhadap bentuk *mandibula* yang menghasilkan nilai diskriminan 100% menjadikan metoda penentuan jenis kelamin secara morfometri lebih mudah dan murah dibandingkan teknik *PCR* kecuali apabila tengkorak yang ditemukan hanya sepotong kecil.

Inoue (1992) melakukan penelitian dengan menggunakan bentuk lateral tengkorak yang dikwantifikasi dengan mengukur jarak antara pusat *auris externa* dengan kontur tengkorak mulai dari *rhinion* sampai akar *processus mastoideus*. Lengkung tersebut dibagi dengan interval 5°. Hasilnya kemudian dibuat fungsi diskriminannya dan hanya menghasilkan akurasi 86% untuk laki-laki dan 90% untuk perempuan.

Hong (1992) melakukan penentuan jenis kelamin pada tengkorak populasi Cina menggunakan analisis diskriminan *multiple stepwise*. Kedua cara ini selain rumit, memerlukan pengalaman untuk mengukur titik-titik antropometri (41 pengukuran), dan juga memerlukan tengkorak yang utuh, sedangkan sering pada kasus forensik tengkorak ditemukan tidak utuh. Bagian yang paling tahan terhadap kerusakan yaitu bagian dahi.

Pada penelitian ini analisis Fourier digunakan juga untuk kuantifikasi bentuk dahi dan bagian belakang kepala. Analisis Fourier telah banyak digunakan untuk menganalisis gelombang pada berbagai bidang ilmu mulai dari ilmu teknik sampai ilmu kedokteran. Elektroencephalogram atau electrocardiogram umpamanya adalah gelombang-gelombang yang dianalisis dengan metode Fourier. Karena amplitudo harmoniknya telah dinormaliser (dibagi dengan A_0) maka karakteristik bentuk objek dapat dianalisis tanpa terpengaruh efek besaran *size*. Pada analisis Fourier, amplitudo harmonik menggambarkan karakteristik bentuk, Amplitudo urutan yang kecil berhubungan dengan lipatan yang kasar konrur dan urutan yang lebih tinggi berhubungan dengan lipatan yang halus. Makin tidak rata bentuknya, makin superior harmonik urutan yang lebih tinggi terhadap harmonik urutan yang rendah. Apabila bentuk dari dua gelombang diperbandingkan, bentuk konturnya lebih tidak rata apabila harmonik-harmonik urutan yang lebih tinggi lebih besar. Seperti terlihat pada tabel 5.16 , harmonik no 3 keatas lebih besar pada pria dibandingkan wanita. Jadi terbukti bentuk dahi pria secara kuantitatif lebih tidak rata dibanding dahi wanita.

Keuntungan dengan metode ini ialah, seorang yang tidak terlatih sekalipun dapat menentukan jenis kelamin tengkorak dengan mudah hanya dengan mengikuti petunjuk yang mudah dan jelas, karena *tracing* kontur tengkorak dari nasion ke bregma dengan alat digitizer sangatlah mudah. Demikian juga program yang dirancang dalam bahasa BASIC dapat dengan mudah di Install pada hampir semua jenis Komputer PC. Akurasinya ternyata lebih tinggi dari pada seksing dengan mata - *visual*, demikian juga lebih tinggi dari pada hanya menggunakan ukuran jarak titik-titik kranimetri.

Penelitian ini juga membuktikan bahwa nilai diskriminan jenis kelamin bagian tulang tengkorak berturutan adalah belakang kepala sebesar 68%, dahi sebesar 91,58%, neurokranium sebesar 93,6% dan mandibulae sebesar 100%. Hal ini

menunjang teori perkembangan *craniofacial* yang menyatakan bahwa neurokranium tidak mengalami banyak perubahan postnatal sedangkan bagian dahi, *basis cranii* dan *mandibulae* mengalami perubahan dan menimbulkan perbedaan antara laki-laki dan perempuan karena pada perempuan pertumbuhan akan berhenti pada sekitar 18 tahun karena pengaruh estrogen (Frank, 1995)

Hasil penelitian membuktikan bahwa kuantifikasi shape dengan analisis Fourier dan elliptical Fourier meningkatkan nilai diskriminan penentuan jenis kelamin tengkorak, dengan demikian hipotesis 3.2.4 dan hipotesis 3.2.5 terbukti. Mandibula merupakan bagian tengkorak yang mempunyai nilai diskriminan tertinggi yaitu 100% diikuti oleh neurokranium sebesar 93,6%

Dengan melakukan *superimpose* dari rerata bentuk kontur mandibula laki laki dan perempuan ternyata **hipotesis 3.3.6 yang menyatakan bahwa bagian processus condylaris dan processus coronoideus merupakan bagian dari mandibula yang mempunyai nilai diskriminan penentuan jenis kelamin tertinggi(lihat lampiran 3) terbukti**

Ini juga merupakan suatu **penemuan baru**, suatu **indikator morfologis baru** dari dimorfisme seksual kerangka manusia.