



Literature Review

Estimasi Usia Dental Berdasarkan Pendekatan Biomolekuler

Dental Age Estimation Based on the Biomolecular Approach

Rosalina Intan Saputri*

Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Kristen Maranatha, Jalan Surya Sumantri 65, Sukawarna, Sukajadi, Kota Bandung 40164, Indonesia.

Received date: April 5th, 2020; reviewed date: Mei 14th, 2020; revised date: Mei 18th, 2020; accepted date: Mei 20th, 2020
DOI : 10.18196/di.9115

Abstrak

Estimasi usia merupakan bagian penting dalam proses identifikasi dalam praktik forensik. Gigi merupakan bagian dari tubuh manusia yang paling kuat dan tahan terhadap pengaruh lingkungan sehingga dapat digunakan sebagai salah satu variabel estimasi usia, terutama pada individu yang telah meninggal. Awalnya, studi maupun aplikasi metode estimasi usia dental umumnya menggunakan perubahan morfologi yang diamati dari gambaran radiograf berdasarkan pertumbuhan gigi geligi. Seiring dengan kemajuan teknologi, metode biomolekuler mulai berkembang dan digunakan dalam estimasi usia dental. Tinjauan pustaka ini bertujuan untuk memaparkan metode biomolekuler terkini yang dapat diaplikasikan pada gigi. Estimasi usia dental menggunakan pendekatan biomolekuler dapat diamati dari modifikasi DNA, protein, atau epigenetik. Penelitian berkaitan dengan *Aspartic Acid Racemization* dan Metilasi DNA dengan sampel dental mulai meningkat sebagai metode yang dapat digunakan dalam aplikasi pada kasus forensik. Meskipun masih terdapat kelemahan seperti metodologi yang tidak konsisten dan akurasi yang kurang dibandingkan dengan perubahan morfologi, metode biomolekuler dapat memberikan kontribusi potensial pada estimasi usia dental.

Kata Kunci: Analisis biomolekuler; Biologi molekuler; Estimasi usia; Estimasi usia dental; Odontologi forensik

Abstract

*Age estimation is an essential part of the identification process in forensic practice. Teeth are one of the most durable pieces of the human body. Therefore, teeth were used as age estimation variables, especially for the deceased. Initially, dental age estimation methods were mainly based on the morphological changes in tooth development, which could be observed in radiographs. Later on, as the advancement of technology, molecular methods began to develop and adopted in dental age estimation. This review presents current methods of biomolecular, which could be applied in dental age estimation. Dental age estimation using changes in biomolecular could be observed by modification of DNA based, protein-based, and epigenetic. Study regarding methods such as *Aspartic Acid Racemization* and DNA Methylation with dental sample has gradually increased as the applicable method in forensic casework. Even though the drawbacks such as inconsistency of methodology or less of accuracy compare to morphological methods, biomolecular methods are becoming a potential contribution for dental age estimation.*

Keywords: Biomolecular analysis; Molecular biology; Age estimation; Dental age estimation; Forensic odontology

* Corresponding author, e-mail: rosalina.saputri@gmail.com

PENDAHULUAN

Identifikasi individu merupakan salah satu bagian dari bidang odontologi forensik, seperti pada kasus kecelakaan masal, investigasi hukum, tindakan kriminal, maupun proses diagnosis dalam perawatan tertentu di bidang kesehatan.¹ Usia adalah salah satu informasi yang penting dalam proses identifikasi, terutama jika identitas individu tersebut tidak diketahui atau tidak terdokumentasi.^{2,3} Tidak hanya pada korban meninggal, penentuan usia menjadi penting dalam hal pemenuhan hak asasi manusia, terutama pada kasus imigrasi penduduk (*refugee*) dan pencarian suaka (*asylum seeker*).³

Perkembangan studi tentang estimasi usia dalam bidang forensik pada awalnya menggunakan pendekatan metode melalui pemeriksaan pada tulang dan gigi.^{3,4} Gigi menjadi parameter penting yang dapat digunakan untuk estimasi usia atau dikenal dengan metode estimasi usia dental. Hal ini dikarenakan gigi memiliki ciri-ciri morfologi yang berbeda seiring dengan pertambahan usia yang disebabkan oleh proses seperti kalsifikasi email dan dentin, perkembangan mahkota, dan perkembangan akar hingga terbentuk sempurna.^{5,6} Metode estimasi usia dental yang banyak diteliti adalah analisis melalui pengamatan pertumbuhan gigi geligi pada radiograf. Metode ini dipilih karena mudah dilakukan dan tidak invasif, terutama pada kasus estimasi usia individu yang masih hidup.^{7,8} Namun, akurasi pada metode ini mengalami penurunan pesat setelah semua perkembangan gigi selesai.⁹ Selain itu, penggunaan radiograf yang berkaitan dengan paparan radiasi menjadi salah satu kekurangan dalam penelitian yang bertujuan untuk pengembangan berbagai metode estimasi usia dental.⁴

Pendekatan biomolekuler dalam studi estimasi usia dental saat ini mulai berkembang.^{10,11} Perkiraan usia berdasarkan pada perubahan biomolekuler seiring dengan pertambahan usia individu dapat diamati dari modifikasi molekuler berbasis DNA, modifikasi molekuler

berbasis protein, maupun modifikasi epigenetik.⁴ Berbagai metode molekuler tersebut memiliki akurasi, keuntungan, serta kekurangan masing-masing. Namun, dengan adanya pendekatan biomolekuler yang dapat diaplikasikan pada gigi, metode tersebut dapat digunakan untuk meningkatkan informasi dalam estimasi usia dental dan sebagai alternatif jika metode radiograf tidak dapat digunakan.^{12,13}

PEMBAHASAN

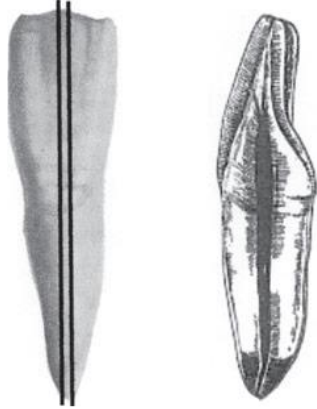
Penerapan Analisis Biomolekuler terhadap Estimasi Usia pada Gigi

Estimasi usia menggunakan pendekatan biomolekuler dapat dilakukan berdasarkan analisis perubahan pada sekuens DNA sel, DNA mitokondrial (mtDNA), dan juga perubahan epigenetik, yang tidak mempengaruhi DNA.¹⁴ Jaringan di rongga mulut, maupun gigi memiliki berbagai sel yang dapat menjadi sumber material genetik.¹ Beberapa metode yang dapat diaplikasikan pada gigi dan dapat menunjukkan korelasi dengan usia kronologis antara lain adalah *aspartic acid racemization* (AAR), mutasi DNA mitokondrial, pemendekan telomer, *advanced glycation end-products* (AGEs), dan metilasi DNA.

Aspartic acid racemization (AAR)

AAR masih menjadi metode estimasi usia yang paling berkualitas dalam aplikasi forensik, dengan batas *error* kurang lebih 3 tahun.^{13,15-17} Metode ini menganalisis proses rasemisasi, yaitu konversi asam amino dalam dua bentuk stereoisomerik yaitu L dan D.^{18,19} Organ dalam tubuh manusia lebih banyak menggunakan asam amino L dalam sintesis protein, sedangkan asam amino D/D-*aspartic acid* (D-Asp) terakumulasi seiring dengan pertambahan usia.¹⁹ Jumlah dari D-Asp menunjukkan korelasi dengan usia pada berbagai jaringan pada tubuh manusia.^{15,19} Proses penuaan pada jaringan enamel, dentin, dan kartilago menunjukkan tingkat rasemisasi yang lebih tinggi, dan juga

tingkat korelasi antara rasio D-Asp/L yang lebih tinggi, dibandingkan tulang.¹⁵ Analisis AAR juga dapat dilakukan pada jaringan tubuh lain seperti otak, mata, paru-paru, kulit, dan darah (eritrosit).¹⁹



Gambar 1. Bagian dentin yang digunakan untuk menentukan rasio D-Asp/L oleh Ohtani dan Yamamoto.¹⁷ (Kiri) Garis hitam menandakan garis pemotongan gigi. (Kanan) Gambaran potongan melintang dari permukaan gigi yang telah dipotong.

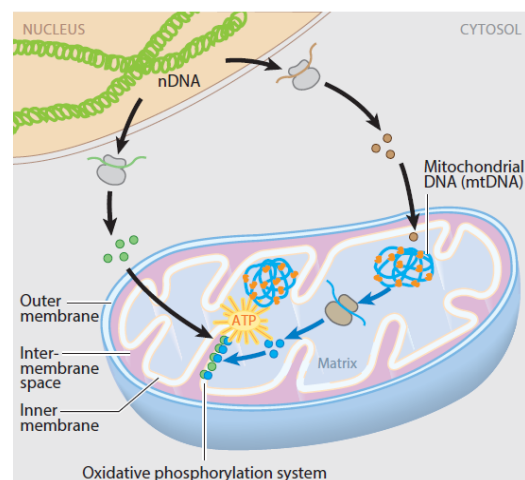
Pemeriksaan AAR pada enamel dan dentin dapat dilakukan dengan metode kromatografi gas/cair dan dikombinasikan dengan *mass spectrometry*.^{20,21} Hasil yang paling baik ditunjukkan dari sampel utuh dentin pada akar gigi monoradikular, karena keseluruhan dentin lebih mudah diambil sebagai sampel.²² Akan tetapi, studi dari Wochna *et al.* menunjukkan bahwa 2-3 mg dentin sudah dapat untuk memberikan hasil yang memadai pada metode ini.¹⁷ Proses rasemisasi terhenti pada saat kematian karena penurunan suhu tubuh secara drastis. Namun, kondisi penguburan, seperti suhu disekitar jenazah, juga dapat mempengaruhi nilai L/D-Asp karena protein yang masih dapat larut.^{13,17} Oleh karena itu, analisis AAR dari enamel dapat menjadi pilihan yang lebih baik karena protein pada enamel terlindungi oleh struktur kristalin yang lebih kuat terhadap pengaruh lingkungan, walaupun korelasi antara raseminasi pada enamel tidak sebaik pada dentin.^{13,22}

Tidak ada perbedaan hasil AAR dari gigi sebelah kiri atau kanan, sedangkan tingkat rasemisasi lebih tinggi pada bagian lingual dari mahkota gigi dibandingkan

bagian buccal karena bagian lingual lebih banyak terpapar pada suhu tinggi.²² Jumlah asam amino D-Asp juga dapat termodifikasi karena penyakit yang berhubungan dengan penuaan seperti katarak, Alzheimer, osteoarthritis, dan pada kondisi jenazah yang terbakar.^{18,19} Meskipun demikian, AAR masih menjadi metode pilihan untuk estimasi usia individu, terutama untuk identifikasi usia saat kematian (*age-at-death*).^{19,22}

Mutasi DNA mitokondrial

DNA Mitokondrial (mtDNA) telah umum digunakan untuk proses identifikasi manusia dan dapat diekstraksi dari dentin, sementum, pulpa, bahkan kalkulus pada gigi.²³⁻²⁵ Pertambahan usia dapat dilihat dari pengukuran dari penghapusan mtDNA (*mtDNA deletion*).^{18,26} Proses produksi energi dalam mitokondria melibatkan oksidasi dari glukosa dan lipid untuk memproduksi *adenosine triphosphate* (ATP) dan melepaskan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan pada mtDNA. Kerusakan ini berupa akumulasi penghapusan, secara khusus merupakan penghapusan *base-pair* 4977 atau disebut *common deletion*.¹⁸ Selain itu, ditemukan hubungan antara penuaan dengan mutasi mtDNA pada regio A189G, T408A dan T414G pada jaringan seperti sel-sel buccal maupun otot skeletal.²⁷



Gambar 2. Rantai respirasi dan sintesis ATP pada mitokondria. Seluruh protein yang diperlukan untuk aktivitas mtDNA dikode pada nukleus, disintesis pada sitosol, dan disalurkan ke dalam mitokondria.²⁸

Pada metode ini, sampel dari mtDNA diekstraksi dari dentin dan pulpa, kemudian dilakukan amplifikasi pada *hypervariable region 2* (HV2).^{26,29} Hasilnya, ditemukan penurunan dari jumlah mtDNA pada dentin pada kelompok usia yang lebih tua, sehingga terdapat korelasi negatif yang tinggi antara usia dengan amplifikasi mtDNA.^{26,29} Sedangkan pada sampel mtDNA yang diekstraksi dari pulpa didapatkan korelasi yang lebih rendah dibandingkan dengan dentin.²⁶

Kelemahan dari metode adalah tidak memiliki akurasi setinggi metode AAR, terutama rendahnya akurasi pada usia ekstrim di bawah 20 tahun dan di atas 70 tahun.^{18,26} Sedangkan kelebihan metode ini adalah ukuran sampel yang kecil yang hanya membutuhkan sebagian fragmen kecil dari dentin (200mg), proses yang lebih mudah, dan terjangkau bagi laboratorium forensik.²⁶

Pemendekan telomer

Telomer terletak pada bagian akhir kromosom dan berfungsi untuk mempertahankan integritas kromosom tersebut.^{18,30} Telomer berhubungan dengan penuaan karena (1) sebagian kecil dari telomer DNA hilang setiap pembelahan sel, (2) telomer mengalami pemendekan karena kerusakan oksidatif, dan (3) ketika panjang telomer mencapai batas kritis tertentu, sel akan memasuki tahap *senescence* dan/atau apoptosis.³⁰

Pada gigi, DNA telomerik banyak didapatkan pada pulpa gigi.^{31,32} DNA telomerik pada pulpa dua kali lebih banyak dibandingkan pada gingiva³¹ dan secara signifikan lebih banyak ditemukan pada gigi molar dibandingkan gigi lainnya.³² Pemendekan telomer terbukti memiliki korelasi yang kuat dengan penambahan usia.³¹⁻³³ Namun, studi pada rumus perhitungan estimasi usia yang didapatkan dari pemendekan telomer masih menunjukkan standar *error* yang besar sehingga metode ini tidak dianjurkan untuk digunakan sebagai metode tunggal dalam estimasi usia yang krusial untuk keperluan

identifikasi.³² Selain itu, beragamnya metode yang digunakan untuk pengukuran pemendekan telomer menyebabkan proses reprodutivitas yang kurang dari metode ini.^{4,34}

Advanced glycation end-products (AGEs)

AGEs adalah hasil dari reaksi Maillard, yaitu reaksi reduksi glukosa dan glisin, yang bereaksi dengan kelompok amino bebas dari protein seperti residu lisin atau arginin. AGEs yang terbentuk dari *intake* makanan dan diproduksi dari proses metabolisme tubuh akan dikeluarkan (eksklusi) oleh tubuh.^{18,35} Ketidakseimbangan antara produksi dan ekskresi menyebabkan AGEs akan terakumulasi seumur hidup pada jaringan yang berbeda-beda.³⁵ Akumulasi ini dapat diukur dari perubahan warna dengan *colorimeter* atau *spectrophotometer*.¹⁸

AGEs dapat ditemukan hampir di seluruh jaringan gigi dan rongga mulut, seperti dentin, pulpa, jaringan periodontal, oral mukosa, dan juga saliva.³⁶⁻³⁸ Akumulasi AGEs pada dentin mengakibatkan perubahan warna dari kolagen dentin menjadi lebih coklat dan strukturnya menjadi lebih keras.³⁷ Keberadaan AGEs juga berkorelasi dengan beberapa penyakit, seperti diabetes, penyakit jantung, arthritis, trauma, dan penyakit neurodegeneratif.^{35,36} AGEs yang ditemukan pada jaringan periodontal memiliki hubungan dengan inflamasi jaringan periodontal, seperti pada kasus periodontitis.³⁸ Oleh karena itu, estimasi usia menggunakan akumulasi AGEs akan terganggu karena adanya penyakit sistemik.³⁸ Selain itu, metode ini memberikan hasil estimasi usia dengan deviasi yang besar terutama pada gigi dengan lesi karies atau gigi yang terbakar karena kondisi-kondisi tersebut menyebabkan perubahan warna dari dentin.^{37,38}

Metilasi DNA (DNA Methylation)

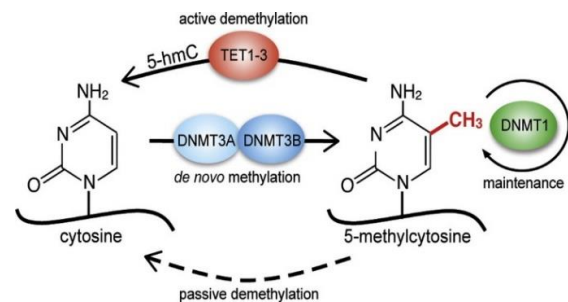
Metilasi DNA adalah proses modifikasi dari karbon atom 5' pada residu

sitosin yang diikuti oleh guanin sehingga disebut dengan dinukleotida CpG(s)/CpG-sites.^{4,14} Pada genom, metilasi terjadi pada regio yang kaya akan CpG disebut dengan CpG island.⁴ Protein dan *methyl-CpG-binding domain* akan berikatan secara spesifik pada CpG island, menginduksi represi dan aktivasi transkripsional.¹⁴ Seiring bertambahnya usia, pola metilasi DNA secara bertahap menunjukkan hipometilasi maupun hipermetilasi DNA pada bagian dari *promoter-associate CpG island* tertentu.⁴ Hubungan antara metilasi DNA dan penuaan dapat dideskripsikan dalam dua bagian yaitu *epigenetic drift* dan *epigenetic clock*. Bagian *epigenetic drift* menunjukkan berbagai variasi perubahan pada individu seiring pertambahan usia karena pengaruh lingkungan, sebaliknya bagian *epigenetic clock* hanya berhubungan sangat erat dengan pertambahan usia, sehingga dapat digunakan untuk memprediksi usia kronologis individu.³⁹

Seiring kemajuan teknologi, lebih banyak studi yang menunjukkan bermacam-macam *biomarker* metilasi DNA dan model prediksi usia dari berbagai jaringan seperti darah, saliva, semen, *buccal swabs*, dan gigi.³⁹ Studi pada gigi, menunjukkan akurasi estimasi usia dari CpG-sites pada (*biomarker*) gen ELOVL2, FHL2, dan PENK yang diambil dari pulpa, dentin dan sementum.⁴⁰ Penelitian lain juga menunjukkan hasil yang sama dengan pengamatan pada *biomarker* ASPA, PDE4C, dan EDARADD dari dentin yang terbukti memiliki korelasi untuk memprediksi usia.⁴¹

Estimasi usia dengan metode kombinasi dari metilasi DNA, usia skeletal, dan usia dental dapat menambah akurasi hingga 0,04-0,11 tahun dibandingkan hanya dengan menggunakan kombinasi usia skeletal dan usia dental.¹² Penelitian lebih lanjut diharapkan tidak hanya mengidentifikasi lebih banyak marker metilasi DNA dari jaringan yang berhubungan dengan usia, namun juga mengembangkan standar untuk analisis estimasi usia yang lebih akurat.³⁹ Tipe lain

dari modifikasi epigenetik yang berhubungan dengan penuaan adalah *chromatin remodelling*, modifikasi *posttranslational histone*, dan *noncoding RNA*.^{11,14} Namun studi berkaitan tentang estimasi usia, terutama pada gigi dan rongga mulut lebih banyak berfokus pada analisis metilasi DNA.



Gambar 3. Pathway metilasi DNA. Proses metilasi DNA dikatalisasi oleh enzim *DNA-methyltransferases* (DNMT3A dan DNMT3B). Pola metilasi tetap bertahan karena adanya DNMT1 sepanjang proses replikasi. Demetilasi DNA pasif terjadi jika aktifitas DNMT1 menghilang. Sedangkan demetilasi aktif terjadi karena protein TET1-3 merubah *5-methylcytosine* menjadi *derivate 5-hydroxymethylcytosine* (5hmC).⁴²

KESIMPULAN

Berbagai metode dengan pendekatan biomolekuler telah banyak dikembangkan dalam penelitian maupun aplikasinya dalam estimasi usia dental. Metode-metode tersebut dapat digunakan jika informasi estimasi usia dental berdasarkan pertumbuhan morfologi terbatas. AAR dan Metilasi DNA masih menjadi metode estimasi usia yang paling sering digunakan karena kelebihan dari segi akurasi. Namun, metode biomolekuler pada dental masih memerlukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan prosedur paling optimal dalam memprediksi usia yang lebih akurat sesuai dengan karakteristik pada masing-masing populasi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Krishan, K., Kanchan, T., Garg, A.K. Dental Evidence in Forensic Identification – An Overview, Methodology and Present Status. *Open Dent J*, 2015; 9: 250–256.

2. Brough, A.L., Morgan, B., Rutty, G.N. Postmortem computed tomography (PMCT) and disaster victim identification. *Radiol Med*, 2015; 120(9): 1–9.
3. Franklin, D., Flavel, A., Noble J., Swift L., Karkhanis S. Forensic age estimation in living individuals: methodological considerations in the context of medico-legal practice. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, 2015; 5: 53-66.
4. Freire-Aradas, A., Phillips, C., Lareu, M.V. Forensic individual age estimation with DNA: From initial approaches to methylation tests. *Forensic Sci Rev*, 2017; 29(2): 121-144.
5. Berkovitz, B.K.B., Holland, G.R., Moxham, B.J., *Oral Anatomy, Histology, & Embryology*. Edinburgh: Elsevier. pp. 442-450, 2018.
6. Fehrenbach, M.J., Popowics, T. *Illustrated dental embryology, histology, and anatomy (4th Ed.)*. Missouri: Elsevier Saunders. pp. 51-76, 2016.
7. Kumar, R., Athota, A., Rastogi, T., Karumuri, S.K. Forensic radiology: An emerging tool in identification. *J Indian Acad Oral Med Radiol*, 2015; 27(3): 416–422.
8. Marroquin, T.Y., Karkhanis, S., Kvaal, S.I., Vasudavan, S., Kruger E., Tennant, M. Age estimation in adults by dental imaging assessment systematic review. *Forensic Sci Int*, 2017; 275: 203-211.
9. Jeon, H. M., Jang, S. M., Kim, K. H., Heo, J. Y., Ok, S. M., Jeong, S. H., & Ahn, Y. W. Dental age estimation in adults: A review of the commonly used radiological methods. *J Oral Med Pain.*, 2014; 39(4), 119-126.
10. Divakar, K.P. Forensic Odontology: The New Dimension in Dental Analysis. *Int J Biomed Sci*, 2017; 13(1): 1–5.
11. Bekaert, B., Kamalandua, A., Zapico, S.C., Van de Voorde, W., Decorte, R. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics*, 2015; 10(10): 922-930.
12. Shi, L., Jiang, F., Ouyang, F., Jun, Z. Genetics DNA methylation markers in combination with skeletal and dental ages to improve age estimation in children. *Forensic Sci Int Genet*, 2017; 33: 1–9.
13. Griffin, R.C., Chamberlain, A.T., Hotz, G., Penkman, K.E., Collins, M.J. Age estimation of archaeological remains using amino acid racemization in dental enamel A comparison of morphological, biochemical, and known ages-at-death. *Am J Phys Anthropol*, 2009; 140(2): 244-252.
14. Thomas, C., Zapico, S.C. *Epigenetics: Its Role in Aging, Diseases, and Biological Age Estimation. Dalam Zapico, S.C. Mechanisms Liking Aging, Disease and Biological Age Estimation*. Washington DC: CRC Press Taylor & Francis Group. pp. 245-254, 2017.
15. Zapico, S.C., Ubelaker, D.H. Applications of physiological bases of ageing to forensic sciences . Estimation of age-at-death. *Ageing Res Rev*, 2013; 12: 605–617.
16. Hassan, Q., Rakha, A., Bashir M.Z. Aspartic Acid Racemization with Correlation to Age: A Forensic Perspective. *JCPSP*, 2017; 27(5): 283–287.
17. Ohtani, S., Yamamoto, T. Age Estimation by Amino Acid Racemization in Human Teeth. *J Forensic Sci*, 2010; 55(6): 1630–1633.
18. Zapico, S.C., Thomas, C., Zoppis, S. Age estimation based on molecular biology approaches. *Age Estimation: A Multidisciplinary Approach*. 2019; 2019: 213-223.
19. Zapico, S.C., Thomas, C., Menéndes, S.T. *Aspartic Acid Racemization on Aging. dalam Zapico, S.C. Mechanisms Liking Aging, Disease and Biological Age Estimation*.

- Washington DC: CRC Press Taylor&Francis Group, pp. 11-20, 2017.
20. Wochna, K., Bonikowski, R., Śmigielski, J., Berent, J. Aspartic acid racemization of root dentin used for dental age estimation in a Polish population sample. *Forensic Sci Med Pathol*, 2018; 4(3): 285-294.
 21. Torres T, Ortiz JE, Fernández E, et al. Quaternary Geochronology Aspartic acid racemization as a dating tool for dentine: A reality. *Quat Geochronol* 2014; 22: 43–56.
 22. Ajmal, M. Amino Acid Racemization from Tooth for Age Estimation- An Overview. *Malays J. Forensic Sci.*, 2012; 3(1): 41–45.
 23. Higgins, D., Rohrlach, A.B., Kaidonis, J., Townsend, G., Austin, J.J. Differential Nuclear and Mitochondrial DNA Preservation in Post-Mortem Teeth with Implications for Forensic and Ancient DNA Studies. *PLoS One*, 2015; 10(5): e0126935, 1–17.
 24. Kanzawa-Kiriyama, H., Saso, A., Suwa, G., Saitou, N. Ancient mitochondrial DNA sequences of Jomon teeth samples from Sanganji, Tohoku district, Japan. *J. Anthropol. Sci.*, 2013; 121(2): 89–103.
 25. Ozga, A.T., Nieves-Colón, M.A., Honap, T.P., Sankaranarayanan, K., Hofman, C.A., Milner, G.R., Lewis Jr., C.M., Stone, A.C., Warinner, C. Successful Enrichment and Recovery of Whole Mitochondrial Genomes From Ancient Human Dental Calculus. *Am J Phys Anthropol*, 2016; 160(2): 220–228.
 26. Zapico, S.C., Ubelaker, D.H. Relationship Between Mitochondrial DNA Mutations and Aging. Estimation of Age-at- death. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2016; 71(4): 445–450.
 27. Gordon, R., Zapico, S.C. *Mitochondrial DNA Mutations and Mitochondrial Diseases. Dalam Zapico, S.C. Mechanisms Liking Aging, Disease and Biological Age Estimation.* Washington DC: CRC Press Taylor&Francis Group. pp. 193-200, 2017.
 28. Gustafsson, C.M., Falkenberg, M., Larsson, N.G. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*, 2016; 85: 133-160.
 29. Zapico, S. C., & Ubelaker, D. H. Relationship between mitochondrial DNA mutations and aging. Estimation of age-at-death. *J. Gerontol. A Biol. Sci*, 2016; 71(4), 445-450.
 30. Thomas C., Zapico, S.C. Role of Telomeres in Aging. Dalam Zapico, S.C. *Mechanisms Liking Aging, Disease and Biological Age Estimation.* Washington DC: CRC Press Taylor&Francis Group. pp. 141-149, 2017.
 31. Kumei, Y., Akiyama, H., Onizuka, T., Kobayashi, C. Variation of telomeric DNA content in gingiva and dental pulp. *Arch Oral Biol*, 2011; 56(1): 1641–1645.
 32. Márquez-Ruiz, A.B., González-Herrera, L., Valenzuela, A. Usefulness of telomere length in DNA from human teeth for age estimation. *Int J Legal Med*, 2018; 132(2): 353-359.
 33. Takasaki, T., Tsuji, A., Ikeda, N., Ohishi, M. Age estimation in dental pulp DNA based on human telomere shortening. *Int J Legal Med*, 2013; 117(4): 232–234.
 34. Adserias-Garriga, J. *Forensic Application of Telomere Shortening in Age-at-Death Estimation. Dalam Zapico, S.C. Mechanisms Liking Aging, Disease and Biological Age Estimation.* Washington DC: CRC Press Taylor&Francis Group. pp. 171-184, 2017.
 35. Simm, A., Santos, A.N. *Advanced Glycation Endproducts: An Introduction. Dalam Zapico, S.C. Mechanisms Liking Aging, Disease and Biological Age Estimation.* Washington DC: CRC Press

- Taylor&Francis Group. pp. 59-67, 2017.
36. Ilea, A., Băbțan, A.M., Boșca, B.A., Crișan, M., Petrescu, N.B., Collino, M., Sainz, R.M., Gerlach, J.Q., Cămpian, R.S. Advanced glycation end products (AGEs) in oral pathology. *Arch Oral Biol*, 2018; 93: 22–30.
 37. Miura, J., Nishikawa, K., Kubo, M., Fukushima, S., Hashimoto, M., Takeshige, F., Araki, T. Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine. *Arch Oral Biol*, 2014; 59(2): 119–124.
 38. Greis, F., Reckert, A., Fischer K., Ritz-Timme, S. Analysis of advanced glycation end products (AGEs) in dentine : useful for age estimation? *Int J Legal Med*, 2018; 132(3): 799–805.
 39. Jung, S.E., Shin, K.J., Lee, H.Y. DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids. *BMB Rep*, 2017; 50(11): 546–553.
 40. Giuliani, C., Cilli, E., Bacalini, M.G., Pirazzini, C., Sazzini, M., Gruppioni, G., Franceschi, C., Garagnani, P., Luiselli, D. Inferring Chronological Age from DNA Methylation Patterns of Human Teeth. *Am J Phys Anthropol*, 2016; 159(4): 585–595.
 41. Bekaert, B., Kamalandua, A., Zapico, S.C., Van de Voorde, W., Decorte, R. A selective set of DNA-methylation markers for age determination of blood, teeth and buccal samples. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*, 2015; 5: e144–e145.
 42. Ambrosi, C., Manzo, M., Baubec, T. Dynamics and context-dependent roles of DNA methylation. *J Mol Biol*, 2017; 429(10): 1459-1475.