

Penentuan saat kematian dengan pemeriksaan fragilitas osmotik eritrosit postmortem pada tikus putih galur Sprague-Dawley

Beta Ahlam Gizela¹, Budi Mulyono²

¹Bagian Ilmu Kedokteran Kehakiman, ²Bagian Patologi Klinik
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada
Yogyakarta

ABSTRACT

Beta Ahlam Gizela and Budi Mulyono - *Predicting time of death by postmortem erythrocyte osmotic fragility test in Sprague-Dawley white mouse*

Background: Death cases caused by crime require estimation of the time of death as a guide for searching who is the murderer. The common method has been used is by detecting hypostasis, rigidity, temperature decreasing, and decomposition. These methods are less accurate, since they are influenced by various factors. A new more accurate method is, therefore, required.

Objectives: To establish a new method in predicting time of death by searching for relations between erythrocyte osmotic fragility and time of death.

Methods: This research used Quasi Experiment Design. The subjects were 31 white male of mice 2 months old. The mouse blood was taken in a periodic time: ante mortem, 0, 1, 2, and 3 hours post mortem, and their erythrocyte osmotic fragility was detected by Modification Method of Osmotic Fragility Test. The reagent used was Saline Buffer Phosphate in gradual concentration, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, and 0.6%.

Results: Data taken from this research were analyzed by regression analysis and ROC curve analysis. There was a significant positive correlation between time of death and erythrocyte osmotic fragility ($r^2 = 0.536$, $p < 0.01$). Erythrocyte osmotic fragility of 0.5% (under curve area=0.826, $p < 0.01$) was a cut off point at 1.5 hours post mortem (MSS=154.4%).

Conclusion: Post mortem erythrocyte osmotic fragility test have a value in predicting time of death. Erythrocyte osmotic fragility test of 0.5% occurred at 1.5 hours post mortem.

Key words: time of death - post mortem - erythrocyte osmotic fragility

ABSTRAK

Beta Ahlam Gizela dan Budi Mulyono - *Penentuan saat kematian dengan pemeriksaan fragilitas osmotik eritrosit postmortem pada tikus putih galur Sprague-Dawley*

Latar Belakang: Untuk penyidikan setiap kasus kematian akibat perilaku pelanggaran hukum dibutuhkan perkiraan saat kematian korban guna pelacakan tersangka pelakunya. Metode yang dipergunakan selama ini adalah dengan memeriksa lebam jenazah, kaku jenazah, penurunan suhu, dan pembusukan. Metode tersebut dipengaruhi oleh banyak faktor internal dan eksternal sehingga hasil yang diperoleh memiliki bias yang besar. Dengan demikian perlu dicari metode baru yang memberi hasil yang lebih akurat.

Tujuan: Menemukan metode baru untuk penentuan saat kematian dengan mencari hubungan antara fragilitas osmotik eritrosit dan saat kematian

Bahan dan Cara: Penelitian ini menggunakan rancangan Quasi Eksperimental. Subjek penelitian adalah tikus putih galur Sprague-Dawley jantan usia 2 bulan. Tikus putih diambil darahnya, dibunuh, lalu diambil lagi darahnya dalam rentang waktu 0, 1, 2, dan 3 jam post mortem untuk diperiksa fragilitas osmotik eritrositnya. Pemeriksaan fragilitas osmotik yang dilakukan dengan menggunakan metode modifikasi,

menggunakan larutan salin bufer fosfat konsentrasi 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, dan 0,6%.

Hasil: Data yang dihasilkan dianalisis dengan analisis statistik regresi dan *ROC curve*. Hasil yang didapatkan menunjukkan terdapat korelasi positif yang bermakna antara saat kematian dengan fragilitas osmotik eritrosit ($r^2 = 0,536$, $p < 0,01$). Fragilitas osmotik eritrosit 0,5% (area di bawah kurva = 0,826, $p < 0,01$) merupakan *cutoff point* pada 1,5 jam postmortem (MSS = 154,4%).

Simpulan: Pemeriksaan fragilitas osmotik eritrosit postmortem mempunyai makna dalam memperkirakan saat kematian. Fragilitas osmotik eritrosit 0,5% terjadi pada 1,5 jam postmortem.

(B.I.Ked. Vol. 33, No. 2: 83-88, 2001)

PENGANTAR

Korban kasus kematian yang disebabkan oleh perilaku pelanggaran hukum, seperti kecelakaan, kriminal, atau misterius seringkali ditemukan beberapa saat setelah kematian. Guna penyidikan diperlukan perkiraan saat kematian untuk mencari tersangka pelaku pelanggaran hukum. Selama ini yang dijadikan patokan untuk menetapkan saat kematian adalah pemeriksaan lebam jenazah, kaku jenazah, penurunan suhu, pembusukan, dan adanya alat atau cacang.¹

Schuller² menemukan bahwa lebam jenazah meningkat mulai jam ketiga sampai lima belas setelah kematian. Warna lebam jenazah berubah mulai jam ketiga yaitu dari panjang gelombang 575 nm meningkat 2 nm tiap jamnya. Permasalahan kemudian muncul karena warna dari lebam jenazah bervariasi menurut sebab kematiannya.²

Saat mulai terjadinya kaku jenazah sangat bervariasi, tetapi biasanya mulai 3 sampai 6 jam setelah kematian, tergantung pada suhu udara, pengaruh dari dalam jenazah serta dari lingkungan yang lain. Kekakuan terjadi antara lain karena peningkatan kadar asam laktat pada otot jenazah. Kekakuan ini akan menyeluruh kira-kira dalam waktu 6 sampai 12 jam. Delapan belas sampai 36 jam kemudian kekakuan ini menetap, dan kemudian mulai menghilang seiring terjadinya pembusukan.

Proses pembusukan jenazah atau lebih tepatnya proses dekomposisi dapat dibedakan menjadi dua, yaitu proses pembusukan dan proses mumifikasi. Proses dekomposisi ini terjadi pada rentang waktu yang sangat bervariasi, tergantung pada kondisi lingkungan, pakaian yang dikenakan, dan sterilitas jenazah. Proses ini terjadi setelah lebam jenazah dan kaku jenazah.²

Penelitian yang berhubungan dengan penentuan saat kematian yang banyak dilakukan adalah yang berkaitan dengan kejadian yang lama, yaitu

berkisar antara beberapa bulan sampai beberapa puluh tahun, dengan penghitungan kadar luminol dalam tulang³, kadar Strontinum 90 dalam tulang⁴, dan berbagai pemeriksaan antropologi.⁵

Pemeriksaan untuk perkiraan saat kematian dalam jangka pendek belum banyak diteliti, sehingga penulis mengalami kesulitan untuk membuat perbandingan-perbandingan dengan penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya. Sebuah penelitian menemukan bahwa melatonin, yaitu suatu hormon pineal dapat memberi petunjuk mengenai saat kematian dengan mengukur kadar hormon dalam kelenjar pineal secara keseluruhan. Namun demikian pemeriksaan kadar melatonin dalam darah dan urine memberi hasil yang tidak akurat.⁶ Penelitian lain mengungkapkan bahwa terjadi penurunan kadar ATP dalam jaringan otak anjing secara bertahap sesuai dengan lamanya saat kematian.⁷

Dari penjelasan di atas tampak bahwa dasar untuk penetapan saat kematian masih mempunyai keterbatasan antara lain berupa interval waktu yang masih terlalu lebar, faktor eksternal dan internal yang mempengaruhi sangat bervariasi, serta pemeriksaan penunjang yang masih rumit. Dari berbagai keterbatasan tersebut dibutuhkan suatu metode baru yang dapat menghasilkan perkiraan saat kematian yang lebih akurat. Pemikiran: bahwa pada setiap proses kematian semua proses dalam tubuh berhenti sehingga proses fisika maupun proses biokimiawi, termasuk siklus Krebs, berhenti.

Pada siklus Krebs dihasilkan ATP (*Adenosine Tri-Phosphate*). Jika siklus Krebs berhenti maka berhenti pula produksi ATP⁸. Dengan demikian pada tubuh jenazah akan terjadi penghentian produksi ATP. Sedangkan konsumsi ATP tetap terjadi karena setelah proses kematian tidak seluruh kehidupan selular langsung berhenti.²

Peran ATP dalam eritrosit adalah sebagai sumber tenaga yang diperoleh dari proses glikolisis

anaerob untuk mempertahankan kehidupan eritrosit. Peran ATP penting untuk menjaga keseimbangan ion Na^+ dan K^+ intra dan ekstraselular dengan menjaga integritas membran eritrosit. Penurunan kadar ATP akan menyebabkan integritas sel menurun sehingga terjadi perpindahan kation intra dan ekstrasel. Ion K^+ keluar dari sel, ion Na^+ masuk ke dalam sel dengan disertai molekul air. Gangguan keseimbangan ion akan menyebabkan perubahan bentuk eritrosit dari bentuk diskus menjadi sferis. Sel bentuk sferis ini mempunyai deformabilitas yang kurang dan fragilitas yang tinggi.⁹ Berdasarkan keadaan di atas kiranya dapat dijelaskan adanya perbedaan fragilitas osmotik eritrosit antara darah yang baru diambil dari donor dengan darah yang telah diinkubasikan. Darah yang telah diinkubasikan memiliki fragilitas osmotik yang lebih tinggi daripada darah yang baru.^{9,10}

Dari penelitian yang pernah dilakukan terhadap darah donor di Bank Darah didapatkan bahwa terdapat hubungan antara kenaikan fragilitas osmotik eritrosit dengan lama penyimpanan darah. Kenaikan fragilitas tersebut dapat dihambat dengan penambahan ATP.⁹ Pada penelitian yang lain didapatkan bahwa penambahan asam laktat ke dalam darah secara *in vitro* akan meningkatkan fragilitas osmotik eritrositnya.¹¹

Penelitian ini dilakukan untuk mencari alternatif metode penetapan saat kematian dengan mencari hubungan antara fragilitas osmotik eritrosit post-mortem dengan saat kematian.

BAHAN DAN CARA

Penelitian ini menggunakan bahan hidup tikus putih galur Sprague-Dawley (SD) jantan usia 2 bulan. Spesimen yang diperiksa adalah darah.

Bahan kimia yang dipergunakan adalah larutan salin bufer fosfat dengan konsentrasi 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, dan 0,6%. Antikoagulan yang dipergunakan adalah heparin.

Rancangan penelitian yang dipilih adalah Quasi Eksperimental menggunakan tikus putih galur SD jantan umur 2 bulan. Jumlah sampel 31 ekor. Dua ekor hewan uji dikeluarkan dari penelitian ini karena kesalahan prosedur pengambilan sampel sehingga darah antemortem mengalami penjendalan.

Penelitian dilakukan dengan mengambil darah tikus putih dari jantung pada beberapa interval waktu

yaitu pada saat masih hidup, pada saat baru dibunuh (jam ke-0), dan 3 kali pengambilan berikutnya dengan interval waktu satu jam. Untuk mempermudah pengambilan darah, darah diambil dari jantung. Pengambilan darah ini masih dimungkinkan karena setelah mati, darah yang berada dalam tubuh tidak akan menjendal karena habisnya fibrinogen dan kalsium dalam darah serta adanya pacuan kelenjar adrenal pada saat menjelang kematian yang mengakibatkan aktivitas fibrinolitik serum meningkat.¹² Pada beberapa penelitian juga terungkap bahwa setelah kematian terjadi peningkatan fibrinolisin yang menghambat koagulasi.² Dengan demikian pengambilan darah setelah kematian masih memungkinkan dalam jangka waktu yang cukup lama, selama darah masih ada dalam rongga jantung dan pembuluh darah.

Tikus dibunuh dengan cara luksasi vertebra servikal. Cara ini dipilih untuk mendapatkan kondisi yang mirip dengan mayoritas sebab kematian yang dijumpai di lapangan. Darah yang diambil diberi antikoagulan heparin dan diperiksa fragilitas osmotik eritrositnya. Teknik pemeriksaan yang dipilih adalah dengan Metode Fragilitas Osmotik Eritrosit Modifikasi.¹³

Data yang dicatat adalah tingkat konsentrasi larutan salin buffer fosfat yang menyebabkan eritrosit lisis dengan sempurna pada tiap waktu pemeriksaan. Analisis regresi dilakukan untuk menentukan hubungan antara fragilitas osmotik eritrosit dan saat kematian dan analisis *receiver operating characteristic (ROC) curve* untuk menentukan *cut off* tingkat fragilitas osmotik eritrosit dalam penentuan saat kematian. Untuk analisis *ROC curve* data antemortem tidak disertakan.

HASIL PENELITIAN

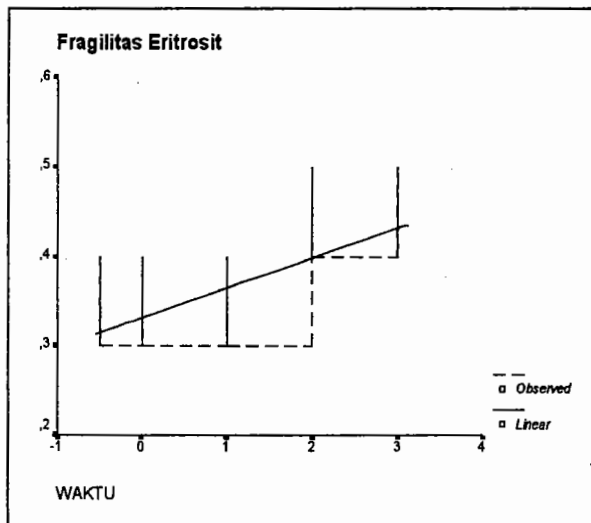
Dari 31 subjek penelitian didapatkan 155 kasus. Dari TABEL 1 tampak terjadi kecenderungan peningkatan rerata fragilitas osmotik eritrosit pada tiap interval waktu pemeriksaan.

Hasil analisis statistik menunjukkan adanya korelasi positif yang bermakna antara saat kematian dengan fragilitas osmotik eritrosit ($r^2 = 0,536$, $p < 0,01$) yang tampak pada GAMBAR 1.

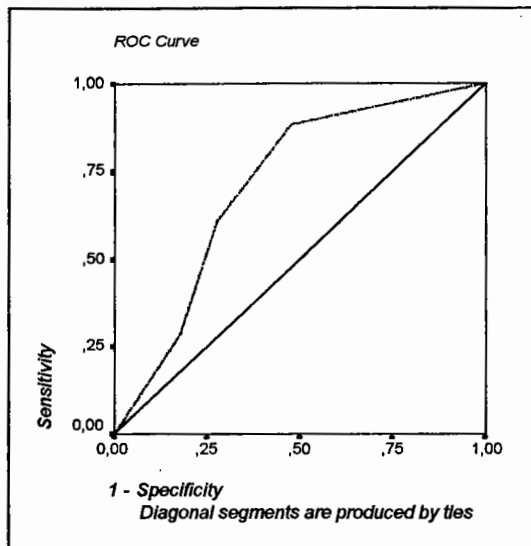
GAMBAR 2, 3, dan 4 merupakan *ROC curve* untuk menunjukkan kemampuan *cut off* fragilitas osmotik eritrosit untuk menentukan saat kematian.

TABEL 1. –Rerata hasil pemeriksaan fragilitas osmotik eritrosit tikus putih galur Sprague-Dawley dengan menggunakan Metode Modifikasi

Fragilitas Osmotik Eritrosit (% konsentrasi <i>Phosphate Buffer Saline</i>)				
Antemortem	0 jam Postmortem	1 jam Postmortem	2 jam Postmortem	3 jam Postmortem
0,3065	0,3323	0,3742	0,4065	0,4226

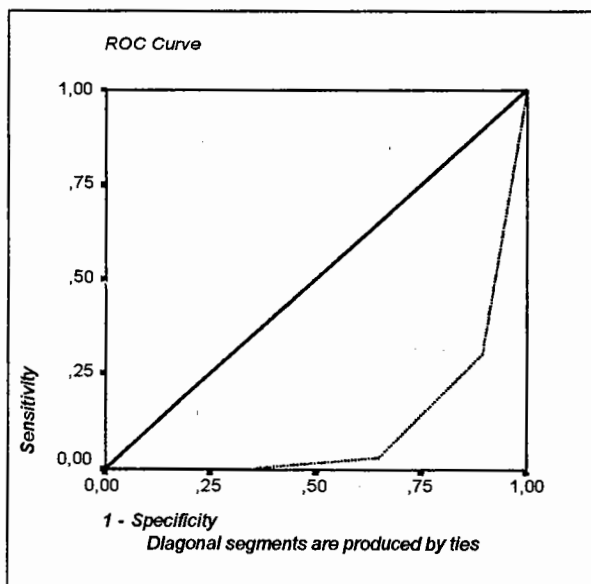


GAMBAR 1. Grafik hubungan antara saat kematian dan fragilitas osmotik eritrosit

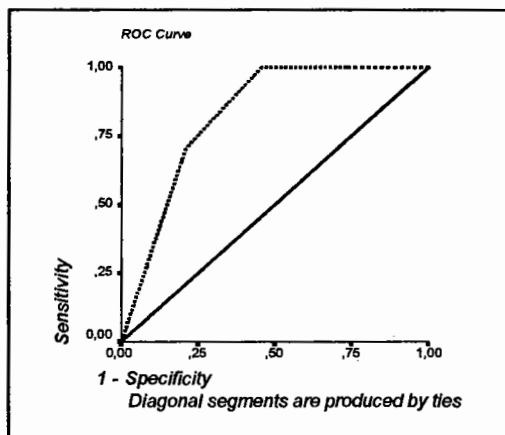


GAMBAR 3. Kurva ROC pada tingkat fragilitas osmotik eritrosit 0,4% terhadap saat kematian

Tingkat fragilitas osmotik eritrosit 0,5% mempunyai area di bawah kurva lebih besar dibanding 0,4% (TABEL 2).



GAMBAR 2. Kurva ROC pada tingkat fragilitas osmotik eritrosit 0,3% terhadap saat kematian



GAMBAR 4. Kurva ROC pada tingkat fragilitas osmotik eritrosit 0,5% terhadap saat kematian

TABEL 2. –Cut off point fragilitas osmotik eritrosit postmortem

Fragilitas Osmotik Eritrosit (%)	Area di bawah Kurva	Std. Error
0,3	0,115	0,031 (p<0,01)
0,4	0,712	0,054 (p<0,01)
0,5	0,826	0,047 (p<0,01)

Waktu terbaik untuk penentuan saat kematian dengan tingkat fragilitas osmotik eritrosit (FOE) 0,5% adalah pada 1,5 jam postmortem (TABEL 3). Hal ini berarti bahwa FOE 0,5% menunjukkan saat kematian 1,5 jam postmortem. FOE kurang dari 0,5% saat kematian kurang dari 1,5 jam, dan FOE lebih dari 0,5% menunjukkan saat kematian lebih dari 1,5 jam.

TABEL 3. -MSS waktu pemeriksaan untuk tingkat fragilitas osmotik eritrosit

Waktu	Sensitivitas	1 - Spesifisitas	MSS (%)
0,5	1,000	0,728	127,2
1,5	1,000	0,456	154,4
2,5	0,700	0,211	148,9

MSS (*Maximum of Sum Specificity and Sensitivity*)

PEMBAHASAN

Untuk mendapatkan tingkat fragilitas osmotik eritrosit antemortem dan postmortem digunakan *Phosphate Buffer Saline* dengan konsentrasi 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, dan 0,6%. Konsentrasi ini dipilih untuk menjaga kemungkinan adanya variasi tingkat fragilitas osmotik eritrosit pada subjek penelitian, dan kemungkinan terjadinya perubahan tingkat fragilitas osmotik eritrosit postmortem.

Dari hasil penelitian ini (GAMBAR 1) tampak bahwa terjadi perubahan fragilitas osmotik eritrosit seiring dengan lamanya saat kematian. Hal ini dapat dijelaskan sesuai dengan penelitian *in vitro* terdahulu mengenai tingkat fragilitas eritrosit dengan lama penyimpanan pada darah manusia di Bank Darah. Semakin lama darah disimpan semakin tinggi tingkat fragilitas eritrositnya^{9,10}. Semakin lama darah disimpan semakin rendah kadar ATP di dalamnya⁹. Begitu juga dengan hasil penelitian *in vitro* lain mengenai peningkatan fragilitas osmotik eritrosit pada penambahan asam laktat dalam darah yang disimpan pada Bank Darah¹¹.

Keadaan *in vivo* sedikit berbeda dengan keadaan *in vitro* yang fragilitas eritrositnya meningkat secara lebih cepat. Pada kondisi *in vitro* kenaikan fragilitas eritrosit darah pada Bank darah terjadi pada hari ke tiga hingga ke lima belas dengan puncaknya pada hari ke sembilan¹⁰. Sedangkan

pada kondisi *in vivo* tikus putih galur SD kenaikan fragilitas osmotik eritrosit terjadi lebih cepat hanya dalam hitungan jam. Peningkatan fragilitas osmotik secara signifikan terjadi mulai saat kematian hingga 3 jam post mortem terjadi. Hal ini dapat dijelaskan karena pada kondisi post mortem terjadi aktivitas enzimatik yang berbeda dengan pada kondisi antemortem. Pada post mortem terjadi aktivitas destruksi enzim yang menyebabkan terjadinya perubahan-perubahan yang mengarah pada proses autolisis¹².

Dari analisis *ROC curve* (GAMBAR 2, 3, 4) didapatkan hasil bahwa tingkat fragilitas osmotik eritrosit (FOE) terbaik adalah 0,5% (TABEL 2) pada 1,5 jam postmortem (TABEL 3). Hal ini mungkin berkaitan dengan adanya penurunan kadar ATP dan peningkatan kadar asam laktat dalam darah dengan jumlah yang menyebabkan terjadinya peningkatan fragilitas osmotik eritrosit yang sangat bermakna.

Fenomena ini dapat dianalogikan dengan terjadinya kaku jenazah akibat penurunan kadar ATP dan peningkatan kadar asam laktat dalam otot manusia yang tampak setelah 2 jam postmortem.² Tampak di sini bahwa perubahan yang terjadi dalam darah dapat dideteksi lebih awal melalui pemeriksaan fragilitas osmotik eritrosit.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat dirumuskan suatu simpulan bahwa terdapat korelasi positif yang bermakna antara saat kematian dengan fragilitas osmotik eritrosit pada tikus putih galur Spague-Dawley.

Dari pemeriksaan yang dilakukan didapatkan hasil bahwa tingkat fragilitas osmotik eritrosit (FOE) 0,5% terjadi pada 1,5 jam postmortem. FOE kurang dari 0,5% berarti saat kematian kurang dari 1,5 jam, dan FOE lebih dari 0,5% berarti saat kematian lebih dari 1,5 jam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada dr. E Henny Herningtyas, staf pengajar di Bagian Patologi Klinik yang telah membantu dalam persiapan dan jalannya penelitian.

KEPUSTAKAAN

1. Soegandhi. Pedoman Pemeriksaan Jenazah Forensik dan Kesimpulan Visum et Repertum di RSUP. Dr. Sardjito, h.1-3, Bagian IKK FK-UGM/IKF-RSUP. Dr. Sardjito, Yogyakarta, 1999.
2. Knight B. Forensic Pathology, 2nd ed., London: Arnold, 1996.
3. Introna F Jr, Di-Vella G, Campobasso CP. Determination of Postmortem Interval from Old Skeletal Remains by Image Analysis of Luminol Test Results (abstract), in: Medline (R) 1999/01-1999/10, 1999.
4. Neiss P, Hille R, Paschke M, Pilwat G, Schnabel A, Neiss C, *et al.* Strontinum 90 for Determination of Time Since Death (abstract), in: Medline (R) 1999/01-1999/10, 1999.
5. Iscan MY, Quatrehomme G. Medicolegal Anthropology in France (abstract), in: Medline (R) 1999/01-1999/10, 1999.
6. Sanders DC, Chaturvedi AK, Hordinsky JR. Melatonin: Aeromedical, Toxicopharmacological, and Analytical Aspects (abstract), in: Medline (R) 1999/01-1999/10, 1999.
7. Chen Y. Study on cerebral ATP level with bioluminescent: Method to estimate the time of death (abstract), in: Medline (R) 1999/01-1999/10, 1997.
8. Mayes PA. Oxidative phosphorylation and mitochondrial transport systems, in: Murray RK, editor. Harper's Biochemistry, London: Appleton and Lange, 1990.
9. Hastuti P. Pengaruh penambahan beberapa macam kadar ATP terhadap fragilitas eritrosit darah CPD donor in Vitro, Laporan Penelitian DPPSP. Yogyakarta: Fakultas Kedokteran UGM. 1990.
10. Nanda K, Mishra U, Mishra B. A study on osmotic resistance of RBC and ESR in stored blood (abstract) in: Medline (R) 1999/01-1999/10, 1998.
11. Kogawa H, Satoh M, Higuchi T, Fujii-Kiyosue A, Sahara T, Kageyama K. Effect of lactic acid on water content and osmotic fragility of erythrocytes in Vitro (abstract) in: Medline (R) 1/96-12/96, 1995.
12. Strassman G, Mass W. Post mortem changes, vital reactions, fat embolism, air embolism, in: Gradwall RBH, editor. Legal Medicine, p.133-136, St. Louis: CV. Mosby Company, 1954.
13. Sianipar O. Uji Validitas pemeriksaan fragilitas osmotik eritrosit (FOE) metode modifikasi. Karya Tulis Akhir Guna Mencapai Derajat Dokter Spesialis Program Studi Patologi Klinik Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta, 1995.