

DISERTASI

Perbandingan Jenis Luka Iris dengan Level Ekspresi mRNA Troponin I, tPA, MCP-1 Dan HMGB-1 Mencit Balb/C Pada Periode *Postmortem Interval* (PMI)

Comparison Types of Incised Wounds with mRNA Expression Levels of Troponin I, tPA, MCP-1, and HMGB-1 in Balb/C Mice During the Postmortem Interval (PMI)



ARFI SYAMSUN

C013202020

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

DISERTASI

PERBANDINGAN JENIS LUKA IRIS DENGAN LEVEL EKSPRESI mRNA
TROPONIN I, TPA, MCP-1 DAN HMGB-1 MENCIT BALB/C PADA
PERIODE POSTMORTEM INTERVAL (PMI)

*Comparison Types of Incised Wounds with mRNA Expression Levels
of Troponin I, tPA, MCP-1, and HMGB-1 in Balb/C Mice
During the Postmortem Interval (PMI)*

Disusun dan diajukan
Oleh

Arfi Syamsun
C013202020

*Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal, 3 Agustus 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

Menyetujui
Promotor


Dr. dr. Rina Masadah, Sp.PA(K), M.Phil, DFM
Nip. 19670429 199210 2 001

Co. Promotor

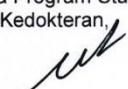
Co. Promotor

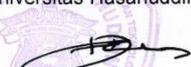

dr. Muh. Husni Cangara, Ph.D, Sp.PA(K), Sp.PF Nip.19770409 200212 1 002


Dr. dr. Berti Julian Nelwan, DFM, M.Kes, Sp.F.Sp.PA(K)
Nip. 19670718 199903 1 002

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,


Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
Nip.19671103 199802 1 001


Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, FINASIM Sp.GK
Nip.19680530 199603 2 001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
Jl. Perintis Kemerdekaan Kampus Tamalanrea Km. 10 Makassar 90245
Telp. (0411) 586010, 585836, 586200 Psw. 2767 Fax. (0411) 586297

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : **Arfi Syamsun**
Nomor Pokok : C013202020
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulis saya berjudul : **Perbandingan Level Ekspresi mRNA Troponin I, tPA, MCP-1 dan HMGB-1 Luka Iris Anteromorten Dibandingkan dengan Luka Iris Perimortem Mencit BALB/C pada Periode *Postmortem Interval* (PMI)**

Adalah karya tulis saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar- benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 19 Juni 2023

Yang menyatakan,



Arfi Syamsun

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, Allah menganugerahkan nikmat keberhasilan menyelesaikan penelitian disertasi pendidikan S3 ini dengan lancar. Saya menyampaikan terimakasih kepada :

1. Promotor dan co-promotor serta penguji disertasi Saya yang sangat banyak memberikan motivasi, saran dan masukan untuk perbaikan penelitian.
2. Bapak, Inaq, ibu tercinta yang selalu mendoakan kelancaran pendidikan S3. Bapakku H. Muhdar ingin sekali melihatku menjadi seorang profesor ilmu kedokteran.
3. Istri tercinta Dewi Wahyuningsih, putri cantikku Mielosita Hasanah, dan putra gantengku Satriya Ananta Syamsun, semoga kalian berdua mencapai pendidikan tertinggi di masa depan.
4. Ketua Prodi S3 Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin sejak periode Yth. Dr. Agussalim Bukhari dan Dr. Irfan Idris dan seluruh dosen serta staf kependidikan yang telah mendukung proses pendidikan dan penelitian.
5. Rektor Universitas Mataram Prof Husni dan Prof Bambang serta Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Mataram Prof Hamsu yang telah memberikan ijin belajar dan sebagian dukungan finansial.
6. Kawan-kawan S3 angkatan 20202 yang selalu menyemangati untuk kuliah ditengah kesibukan tugas-tugas sebagai dokter.
7. Supporting team saya: pak Abd.Rahim Har, Dr. Hairil Anwar, dr. Jaury Sutjianto, dr. Tari dan seluruh pihak yang telah membantu menyelesaikan disertasi ini.

Semoga Allah meridhoi dan selanjutnya penelitian ini dapat diterapkan di masyarakat untuk menungkap kasus kejahatan. Penelitian ini saya persembahkan untuk dunia forensik yang saya cintai. Tiada gading yang tak retak, saya mohon maaf jika ada kekeliruan dan jasa yang tidak terbalaskan. Dalam keterbatasan ini saya siap berkolaborasi dengan semua pihak yang tertarik dengan penelitian forensik molekuler.

Makassar, 8 Juli 2023

Arfi Syamsun

ABSTRAK

ARFI SYAMSUN. *Perbedaan Ekspresi m-RNA Troponin I, t-PA, MCP-1 and HMGB-1 pada Luka Antemortem dan Perimortem dapat Dideteksi Beberapa Hari setelah Kematian* (dibimbing oleh Rina Masadah, Husni Cangara, Berti Julian Nelwan).

Vitalitas luka sulit dibedakan secara visual dan histologis sehingga perlu dilakukan pemeriksaan mRNA yang terlibat dalam reaksi inflamasi. Tujuan penelitian ini adalah menggabungkan pemeriksaan ekspresi m-RNA Tr 1, IPA MCP-1, dan HMGB-1 untuk memprediksi vitalitas luka pada luka antemortem dan perimortem. Sampel penelitian dibagi menjadi 5 kelompok antemortem dan 5 kelompok perimortem. Setiap kelompok berisi 3 ekor mencit balb/c. Periode pengamatan dilakukan pada 0, 12, 24, 48, dan 72 jam setelah kematian. Luka antemortem dibuat dengan cara mengiris punggung mencit dengan pisau bedah sepanjang 2 cm, kemudian mencit dibiarkan hidup selama 30 menit dan kemudian didekapitasi. Sementara luka perimortem dibuat 30 menit setelah kematian. Sebanyak 1 gram jaringan otot yang terluka akan diperiksa dengan RT-PCR sesuai dengan panduan. Data dianalisis dengan ANOVA dan LSD. Hasil penelitian menunjukkan luka antemortem yang diamati segera (0 jam) dan 12 jam setelah kematian menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam rata-rata Tr 1, t-PA, MCP-1, dan HMGB-1m-RNA dibandingkan dengan luka perimortem yang diperiksa 24, 48, atau 72 jam setelah kematian. Selain itu, luka antemortem yang diamati 24, 48, dan 72 jam setelah kematian menunjukkan perbedaan yang signifikan dalam rata-rata m-RNA Tr 1, IPA, MCP-1, dan HMGB-1 dibandingkan dengan luka perimortem yang diperiksa 0, 12, 24, 48, atau 72 jam setelah kematian. Disimpulkan bahwa tingkat ekspresi m-RNA Tr I, t-PA, MCP-1, dan HMGB-1 menunjukkan kemampuan untuk membedakan vitalitas luka, sehingga memungkinkan pendeteksian untuk durasi yang lebih lama setelah kematian.

Kata kunci: m-RNA Tr I, t-PA, MCP-1, HMGB-1, luka iris, vitalitas luka



ABSTRACT

ARFI SYAMSUN. *Tropinin I, PA, MCP-1 and HAIGB-1 mRNA Expression in Incised Antemortem and Postmortem Wounds Being Detectable Several Days of Postmortem Interval* (supervised by Rina Masadah, Husni Cangara, Berti Julian Nelwan)

The research aims at combining Tr I, tPA, MCP-1 and HMGB-1 mRNA expression examinations to predict wound vitality. The wound vitality is difficult to distinguish visually and histologically, so it is necessary to examine mRNA involved in the inflammatory reaction. The samples were divided into 5 antemortem groups and 5 perimortem groups, in which each group contained 3 balb/c mice. The observation periods were 0, 12, 24, 38, 48, and 72 hours after the death. The antemortem wounds were made by slicing the mice's back with a 2-cm-long scalpel, then the mice were left alive for 30 minutes and they were then decapitated. While, the perimortem wounds were made 30 minutes after the mice were decapitated, 1 gram of injured muscle tissue was examined by RT-PCR in accordance with the guidelines. The data were analysed using the ANOVA and LSD tests. The research result indicates the antemortem wounds observed immediately (0 h) and 12 h after the death reveal the significant differences in mean TrI, tPA, MCP-1 and HMGB-1 mRNA compared with the perimortem wounds examined 24, 48, or 72 h after the death. Moreover, the antemortem wounds observed 24, 48, and 72 hours after the death. The research result shows the significant differences in the mean scores of the TrI, tPA, MCP-1, and HMGB-1 mRNA compared with the perimortem wounds examined 0, 12, 24, 48, or 72 hours after the death. It can be concluded that the mRNA expression contents of the Tr I, tPA, MCP-1 and HMGB-1 exhibit the capability to discriminate wound vitality, thereby enabling their detection for an extended duration after the death.

Key words: MRNA Tr 1, tPA, MCP 1, HMGB 1, incised wound, vitality



DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	iError! Bookmark not defined.
KATA PENGANTAR	iii
ABSTRAK	Error! Bookmark not defined.
ABSTRACT.....	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
BAB I PENDAHULUAN.....	12
1.1 Latar Belakang.....	12
1.2 Rumusan Masalah.....	17
1.3 Tujuan Penelitian	17
1.4 Manfaat Penelitian	18
1.5 Orisinalitas penelitian.....	18
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	20
2.1 Epidemiologi Luka Mekanik	20
2.2 Fase penyembuhan luka.....	21
2.2.1 Koagulasi dan haemostasis.....	22
2.2.2 Fase Inflamasi	23
2.2.3 Fase proliferasi	24
2.2.4 Proses penguatan jaringan/maturasi	24
2.3 Peran tPA, MCP 1 dan HMGB1 dalam proses penyembuhan luka	
24	
2.3.1 t plasminogen activator.....	24
2.3.2 MCP 1	27
2.3.3 HMGB 1.....	28
2.3.4 Troponin I (Tnl).....	30
2.4 Faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka	31
2.5 Umur luka	34
2.6 Lama waktu kematian	38
2.7 RNA	40
2.8 Permodelan Sistem Dinamis.....	41
BAB III KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP	42
3.1 Rencana road map penelitian	42
3.2 Kerangka teori	43
3.3 Kerangka konsep	45
3.4 Hipotesis penelitian.....	45
BAB IV METODE PENELITIAN	46
4.1 Rancangan penelitian	46
4.2 Populasi dan sampel.....	46
4.3 Variabel penelitian	47
4.4 Definisi operasional	48
4.5 Bahan dan alat penelitian	48

4.6	Alat penelitian	49
4.7	Prosedur pengumpulan data.....	49
4.8	Tempat dan waktu penelitian	56
4.9	Alur kerja.....	57
4.10	Analisis data	57
4.11	Etika Penelitian	58
BAB V HASIL PENELITIAN		59
5.1	Penelitian Pendahuluan.....	59
5.2	Penelitian Lanjutan	62
5.3	Pemeriksaan mRNA	67
5.4	Normalitas dan variasi data fold change mRNA	69
5.5	Analisis analitik	70
5.6	Hasil uji system dinamik.....	79
BAB VI PEMBAHASAN PENELITIAN.....		81
BAB VII SIMPULAN DAN SARAN		86
7.1	Simpulan.....	86
7.2	Saran	87
DAFTAR PUSTAKA.....		88
KATA PENGANTAR		iii
ABSTRAK		Error! Bookmark not defined.
ABSTRACT		Error! Bookmark not defined.
DAFTAR ISI		vi
DAFTAR TABEL		ix
DAFTAR GAMBAR		x
BAB I PENDAHULUAN.....		12
1.1	Latar Belakang.....	12
1.2	Rumusan Masalah.....	17
1.3	Tujuan Penelitian	17
1.4	Manfaat Penelitian	18
1.5	Orisinalitas penelitian.....	18
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....		20
2.1	Epidemiologi Luka Mekanik	20
2.2	Fase penyembuhan luka.....	21
2.2.1	Koagulasi dan haemostasis.....	22
2.2.2	Fase Inflamasi	23
2.2.3	Fase proliferasi	24
2.2.4	Proses penguatan jaringan/maturasi	24
2.3	Peran tPA, MCP 1 dan HMGB1 dalam proses penyembuhan luka 24	
2.3.1	t plasminogen activator.....	24
2.3.2	MCP 1	27
2.3.3	HMGB 1.....	28
2.3.4	Troponin I (Tnl).....	30
2.4	Faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka	31
2.5	Umur luka	34
2.6	Lama waktu kematian	38
2.7	RNA	40
2.8	Permodelan Sistem Dinamis.....	41

BAB III KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP	42
3.1 Rencana road map penelitian	42
3.2 Kerangka teori	43
3.3 Kerangka konsep	45
3.4 Hipotesis penelitian	45
BAB IV METODE PENELITIAN	46
4.1 Rancangan penelitian	46
4.2 Populasi dan sampel	46
4.3 Variabel penelitian	47
4.4 Definisi operasional	48
4.5 Bahan dan alat penelitian	48
4.6 Alat penelitian	49
4.7 Prosedur pengumpulan data	49
4.8 Tempat dan waktu penelitian	56
4.9 Alur kerja	57
4.10 Analisis data	57
4.11 Etika Penelitian	58
BAB V HASIL PENELITIAN	59
5.1 Penelitian Pendahuluan	59
5.2 Penelitian Lanjutan	62
5.3 Pemeriksaan mRNA	67
5.4 Normalitas dan variasi data fold change mRNA	69
5.5 Analisis analitik	70
5.6 Hasil uji system dinamik	79
BAB VI PEMBAHASAN PENELITIAN	81
BAB VII SIMPULAN DAN SARAN	86
7.1 Simpulan	86
7.2 Saran	87
DAFTAR PUSTAKA	88

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Biomarker pada cedera jaringan musculoskeletal.....	36
Tabel 2. Distribusi rerata fold change mRNA Troponin I, tPA, HMGB 1, MCP 1	67
Tabel 3. Normalitas data fold change mRNA dengan Uji Shapiro-Wilk	69
Tabel 4. Distribusi varians data.....	70
Tabel 5. Hasil Uji ANOVA	70
Tabel 6. Hasil Uji LSD mRNA Troponin 1 pada kelompok antemortem dan perimortem	72
Tabel 7. Hasil Uji LSD mRNA tPA pada kelompok antemortem dan perimortem	74
Tabel 8. Hasil Uji LSD mRNA MCP 1 pada kelompok antemortem dan perimortem	76
Tabel 9. Hasil Uji LSD mRNA HMGB 1 pada kelompok antemortem dan perimortem	78

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Skala Kebaruan Tema	19
Gambar 2. Skala Densitas Tema	19
Gambar 3. Mekanisme tPA dalam Memodulasi Peradangan	26
Gambar 4. Ikhtisar jalur pensinyalan yang diaktifkan pada ligasi MCP-1 ke CCR2	28
Gambar 5. Tissue Injury	30
Gambar 6. Representasi kimia dari filamen tipis unit pengatur	31
Gambar 7. Tahapan Metode Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)	42
Gambar 8. Kerangka Teori	44
Gambar 9. Kerangka Konsep	45
Gambar 10. Alur Kerja	57
Gambar 11. Permodelan Dasar	58
Gambar 12. Gambaran histologis mencit dengan luka antemortem 0 jam Postmortem Interval	59
Gambar 13. Gambaran histologis mencit dengan luka perimortem 0 jam Postmortem Interval	59
Gambar 14. Gambaran histologis mencit dengan luka antemortem 6 jam Postmortem Interval	59
Gambar 15. Gambaran histologis mencit dengan luka perimortem 6 jam Postmortem Interval	59
Gambar 16. Gambaran histologis mencit dengan luka antemortem 12 jam Postmortem Interval	60
Gambar 17. Gambaran histologis mencit dengan luka perimortem 12 jam Postmortem Interval	60
Gambar 18. Gambaran histologis mencit dengan luka antemortem 18 jam Postmortem Interval	60
Gambar 19. Gambaran histologis mencit dengan luka perimortem 18 jam Postmortem Interval	60
Gambar 20. Gambaran histologis mencit dengan luka antemortem 24 jam Postmortem Interval	60
Gambar 21. Gambaran histologis mencit dengan luka perimortem 24 jam Postmortem Interval	60
Gambar 22. Gambaran histologis mencit tanpa luka (mencit control)	61
Gambar 23. area perdarahan disekitar jaringan otot (HE 100x)	61
Gambar 24. infiltrasi minimal sel radang limfosit pada stroma jaringan (HE 400x)	61

Gambar 25. gambaran jaringan otot tanpa area perdarahan dan inflamasi (HE 100x).....	61
Gambar 26. Gambaran jaringan otot bergaris dengan sedikit area perdarahan (anak panah) tidak tampak infiltrasi sel radang (HE 100x) pada kelompok antemortem 0 jam postmortem interval	62
Gambar 27. Gambaran jaringan otot bergaris tanpa area perdarahan dan infiltrasi sel radang (HE 100x) pada kelompok perimortem 0 jam postmortem interval.	62
Gambar 28. Gambaran jaringan otot bergaris tanpa area perdarahan dan infiltrasi sel radang (HE 100x) pada kelompok antemortem 12 jam postmortem interval.	63
Gambar 29. Gambaran jaringan otot bergaris tanpa area perdarahan dan infiltrasi sel radang (HE 100x) pada kelompok perimortem 12 jam.....	63
Gambar 30. Gambaran jaringan otot bergaris tanpa area perdarahan dan infiltrasi sel radang (HE 100x) pada kelompok antemortem 24 jam	64
Gambar 31. Gambaran jaringan otot bergaris tanpa area perdarahan dan infiltrasi sel radang (HE 100x) pada kelompok perimortem 24 jam.....	64
Gambar 32. Gambaran jaringan otot bergaris tanpa area perdarahan dan infiltrasi sel radang (HE 100x) pada kelompok antemortem 48 jam	65
Gambar 33. Gambaran jaringan otot bergaris tanpa area perdarahan dan infiltrasi sel radang (HE 100x) pada kelompok perimortem 48 jam.	65
Gambar 34. Gambaran jaringan otot bergaris dan jaringan lemak matur tanpa area perdarahan dan infiltrasi sel radang (HE 100x) pada kelompok antemortem 72 jam.	66
Gambar 35. Gambaran jaringan otot bergaris tanpa area perdarahan dan infiltrasi sel radang (HE 100x) pada kelompok perimortem 72 jam.....	66
Gambar 36. Histogram ekspresi mRNA Troponin I	67
Gambar 37. Histogram ekspresi mRNA tPA.....	68
Gambar 38. Histogram ekspresi mRNA MCP-1.....	68
Gambar 39. Histogram ekspresi mRNA HMGB-1.....	69
Gambar 40. Grafik Hasil Uji System Dinamik	79

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kasus kejahatan dengan benda tajam dan benda tumpul menjadi kasus terbanyak yang dihadapi dokter forensik di dunia.^{1,2,3,4} Kesuksesan investigasi forensik ditentukan kecepatan dan ketepatan dalam menganalisa barang bukti baik yang ditemukan di tempat kejadian perkara maupun di tempat lain yang relevan dengan peristiwa pidana.^{5,6} Investigasi kasus kejahatan tersebut difokuskan pada beberapa hal, yaitu : intravitalitas luka khususnya umur luka, jenis benda penyebab luka, mekanisme terjadinya luka, kualifikasi luka, sebab kematian dan cara kematian serta identitas pelaku kejahatan.^{7,8,9,10}

Kematian akibat kejahatan seringkali terjadi segera setelah perlukaan atau beberapa menit kemudian. Pada kasus tersebut, tanda-tanda intravital luka dan lama korban mampu bertahan hidup (survival time) setelah menderita luka serta sampai berapa lama tanda-tanda tersebut dapat diamati pasca kematian menjadi perhatian para investigator. Selain kondisi intravitalitas, terdapat fenomena supravital/agonal/perimortem yang berpotensi menjadi perancu interpretasi luka intravital/antemortem. Suatu luka yang terjadi pada rentang sekitar 0-2 jam postmortem disebut sebagai luka perimortem yang mana reaksi intravital masih terjadi pada jaringan tubuh yang belum mengalami kematian seluler. Dengan demikian urgensi penelitian intravitalitas luka pada periode awal perlukaan sangat penting dilakukan terutama untuk mendeteksi mediator-mediator inflamasi yang dilepaskan paling awal di area luka. Kondisi tersebut perlu dibandingkan dengan reaksi intravital pada periode perimortem.^{11,12}

Periode waktu penyembuhan luka dibagi menjadi dua berdasarkan ada tidaknya gambaran mikroskopis infiltrasi sel radang pada jaringan luka, yaitu : waktu luka awal (early wound age) yang mana belum terdapat

infiltrasi sel radang di area luka dan waktu luka lanjut (late wound age) yang mana telah terdapat infiltrasi sel radang di area luka. ^{11,13}

Reaksi inflamasi merupakan tahap awal proses penyembuhan luka, yang selanjutnya akan diikuti oleh proses proliferasi dan maturasi/remodeling. Reaksi inflamasi yang berlangsung dengan baik akan mempercepat penyembuhan luka. Reaksi inflamasi dipengaruhi oleh banyak faktor internal dan faktor eksternal korban. Faktor internal yang mengganggu reaksi inflamasi adalah gizi kurang/buruk dan adanya penyakit yang mengganggu sistem imun. Sedangkan faktor internal yang menyebabkan reaksi inflamasi menjadi lebih besar adalah kondisi higienitas personal yang jelek, luka yang luas dan dalam. Selanjutnya, faktor eksternal yang berkontribusi dalam reaksi inflamasi adalah jenis penyebab luka, akses pelayanan perawatan luka, temperatur dan kelembaban lingkungan.^{14,15} Penelitian luka perlu memperhatikan faktor-faktor di atas untuk homogenisasi sampel penelitian. Kelebihan penggunaan hewan coba dalam penelitian adalah kemudahan dalam homogenisasi sampel penelitian tersebut. ¹¹

Penentuan umur luka menjadi salah satu tantangan utama dalam bidang forensik hingga saat ini. Kepastian umur luka pada kasus kejahatan bermanfaat memperkirakan rentang waktu terjadinya peristiwa kejahatan sehingga mempermudah penegak hukum mengungkap pelaku yang sebenarnya, cara melukai dan benda yang dipergunakan untuk melukai korban serta rangkaian peristiwa perlukaan. Penentuan umur luka menjadi semakin penting jika tidak ada saksi mata yang menyaksikan terjadinya luka pada korban. ^{16, 17, 18}

Metode penentuan umur luka pada kasus korban hidup di Indonesia masih menggunakan parameter makroskopis, sedangkan untuk kasus korban mati menggunakan parameter makroskopis dan pemeriksaan histologi konvensional. Pada kasus korban mati, metode tersebut masih relative memuaskan jika survival time korban di atas 4-6 jam karena perubahan mikroskopis dan makroskopis telah terjadi pada periode waktu tersebut, oleh karena itu umur luka yang terkait masa intravital dapat

ditentukan dengan akurat.^{18,11} Tantangan saat ini adalah pemastian intravitalitas luka pada rentang waktu kurang dari 6 jam yang terjadi menjelang kematian korban, peningkatan akurasi perkiraan umur luka pada periode intravital ini sangat penting ditentukan untuk memperjelas rentang waktu *survival time* korban paska trauma dan menentukan ada tidaknya perlukaan paska kematian somatic sehingga rangkaian peristiwa pidana dapat diuraikan.^{11,19}

Penggunaan messenger RNA (mRNA) untuk menentukan umur luka dan intravitalitas luka telah berkembang dalam 10 tahun terakhir. mRNA yang membawa kode asam nukleat akan terdeteksi lebih awal dalam tubuh daripada produk proteinnya. Dengan demikian pada *survival time* yang singkat menyebabkan hanya mRNA yang terdeteksi, sedangkan proteinnya tidak terbentuk.¹¹

Beberapa peneliti menggunakan metode pemeriksaan imunohistokimia dan *real time polymerase chain reaction* (RT-PCR) untuk mendeteksi dan menghitung level biomarker spesifik pada perlukaan awal kurang dari 4-6 jam yang mana pada periode awal tersebut telah terjadi pelepasan berbagai mediator inflamasi. Beberapa biomarker mediator tersebut yang telah diteliti adalah gen *Cytochrome C Oxidase Subunit 6C* (COX6C), gen *troponin inhibitory (troponin I)*, gen *t plasminogen activator* (tPA), protein *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (LC 3 I), protein LC 3 II, protein, p62, molekul *cluster of differentiation 15* (CD 15), tryptase, FVIIIra.^{20,21,22} Biomarker tersebut diatas merupakan biomarker yang ditemukan pada trauma jaringan kulit dan otot yang merupakan bagian tubuh yang paling rentan mengalami kerusakan sebagai dampak dari kekerasan.¹¹

Troponin I (TnI) adalah subunit penghambatan (*inhibitory*) kompleks troponin dalam filamen tipis sarkomer otot lurik dan memainkan peran sentral dalam regulasi kalsium pada proses kontraksi dan relaksasi otot. Troponin I akan disekresikan oleh otot yang mengalami cedera.²³ Sedangkan t plasminogen Plasminogen activator merupakan kelompok enzim dalam keluarga protease serin yang berperan penting dalam

homeostasis darah (koagulasi/fibrinolisis) dan regulasi matriks, memodulasi respons inflamasi terhadap cedera jaringan dalam berbagai model, dan sebagai sitokin untuk memicu sinyal intraseluler yang dimediasi oleh reseptor.²⁴

Molekul lainnya yang disekresikan maupun disintesis oleh tubuh paska adanya suatu perlukaan adalah *High mobility group box 1* (HMGB1) dan *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP 1). HMGB1 disekresikan secara ekstraseluler oleh monosit teraktivasi dan makrofag atau dilepaskan secara pasif oleh sel nekrotik atau sel tua. HMGB1 ekstraseluler adalah mediator peradangan yang ampuh.²⁵ MCP-1 adalah chemoattractant kuat untuk monosit dan makrofag ke area inflamasi. MCP-1 adalah molekul kelas C–C dari keluarga beta chemokine dan salah satu faktor kunci yang terlibat dalam inisiasi peradangan.²⁶

Penelitian tersebut mayoritas dilakukan pada hewan coba sehingga menimbulkan tantangan penerapan hasil penelitian tersebut pada manusia. Penelitian pada manusia untuk kasus forensik mendapatkan banyak masukan dari sisi etika penelitian. Beberapa peneliti mengantisipasi permasalahan tersebut dengan melakukan kombinasi subjek penelitian, yaitu : hewan coba sebagai target utama perlakuan, sedangkan data yang diperoleh pada subjek penelitian manusia dijadikan sebagai kalibratornya.

11

Penggunaan RNA di bidang forensik mengalami perkembangan pesat saat ini setelah ditemukan metode PCR yang mampu mendeteksi dan mengkuantifikasi jumlah sampel yang sedikit. Pemeriksaan RNA digunakan untuk mendeteksi cairan tubuh seperti sisa-sisa darah, urin, semen, keringat, air liur, dll.²⁷ Penelitian RNA untuk estimasi umur luka dan umur lama kematian pada hewan coba telah berkembang setidaknya dalam 10 tahun terakhir namun masih didapatkan tantangan untuk menerapkan hasil penelitian tersebut pada manusia. Peningkatan level RNA dipergunakan untuk memperkirakan umur luka pada kasus korban hidup,¹¹ sedangkan degradasi RNA atau DNA dipergunakan untuk mengkalkulasi umur lama kematian.^{28,29} Fenomena peningkatan dan penurunan level RNA

perlu diteliti terutama untuk keperluan menjelang kematian yang selanjutnya diperiksa pada periode dekomposisi awal dalam rentang waktu kurang dari 24 jam (early postmortem interval/EPI) paska kematian sesuai dengan kasus nyata di bidang forensik.

Periode dekomposisi awal dipilih dalam penelitian ini karena secara praktis pengamatan lebih mudah dilakukan dan kemungkinan degradasi RNA dan protein yang akan diteliti belum banyak terjadi baik oleh aktifitas otolisis maupun aktifitas mikroorganisme. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa degradasi RNA mulai banyak ditemukan dalam periode diatas 24 jam (late postmortem interval). Beberapa molekul yang terdeteksi meningkat pada EPI adalah late cornified envelope 1C (LCE1C) di kulit,³⁰ mRNA yang menurun adalah Cdc25b mRNA pada jantung,³¹ 5srRNA pada otak.³² Faktor eksternal yang mempengaruhi stabilitas RNA dan protein lainnya adalah temperatur dan kelembaban. Sehingga diperlukan pengendalian faktor tersebut dalam penelitian ini.

Tingkah laku manusia yang mencakup aspek biologis maupun psikologis merupakan suatu sistem yang kompleks. Suatu fenomena biologis dan psikologis tersebut bisa dijelaskan secara linear dan nonlinear dalam suatu sistem, salah satunya adalah sistem dinamis. Dalam bidang Ilmu Kesehatan Masyarakat, sistem dinamis tersebut diperlukan untuk memperkirakan aspek perawatan pasien, mengatur dan mengembangkan praktik lokal, terlibat dalam pengembangan masyarakat, dan mempengaruhi reformasi perawatan kesehatan.³³ Penerapan permodelan dalam sistem dinamis telah diterapkan dibidang penanganan penyakit, contohnya obesitas. Obesitas adalah masalah sistem yang kompleks, yang melibatkan spektrum yang luas mulai dari aspek kebijakan, sosial, ekonomi, budaya, lingkungan, perilaku, dan faktor biologis, yang mana faktor-faktor tersebut sangat kompleks yang saling terkait, lintas sektor, non-linier, dan terdapat hubungan dinamis di antara semua variabel.³⁴

Salah satu aplikasi yang dapat membuat permodelan pada sistem dinamis tersebut adalah Powersim. Oleh karena itu, peneliti ingin membuat sebuah permodelan yang dapat memperkirakan *postmortem interval*

berdasarkan laju level ekspresi biomarker mRNA Troponin I, tPA, MCP 1 dan HMGB 1 dengan menghitung seluruh variable-variabel perancu, variable kendali dan variable antara yang mempengaruhi level ekspresi biomarker.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas rumusan masalah penelitian sebagai berikut Bagaimanakah perbedaan jenis luka iris berdasarkan level ekspresi mRNA Troponin i, tPA, MCP-1 dan HMGB-1 mencit balb/c pada periode *postmortem interval* (PMI)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan Umum :

Mengetahui perbedaan jenis luka iris berdasarkan level ekspresi mRNA Troponin i, tPA, MCP-1 dan HMGB-1 mencit balb/c pada periode *postmortem interval* (PMI)?

Tujuan Khusus :

1. Menentukan level biomarker ekspresi mRNA Troponin I, tPA, MCP 1 dan HMGB 1 otot mencit balb c yang mengalami luka iris antemortem pada periode *postmortem interval* (PMI).
2. Menentukan level biomarker ekspresi mRNA Troponin I, tPA, MCP 1 dan HMGB 1 otot mencit balb c yang mengalami luka iris perimortem pada periode *postmortem interval* (PMI).
3. Membuat permodelan sistem dinamis dengan Aplikasi Powersim untuk memperkirakan *postmortem interval* berdasarkan laju produksi atau destruksi biomarker mRNA Troponin I, tPA, MCP 1 dan HMGB 1.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Manfaat bagi masyarakat

Hasil penelitian dapat berkontribusi mengungkap umur luka, intravitalitas dan mengestimasi lama korban bertahan hidup sehingga kronologis peristiwa pidana beserta pelaku kejahatan dapat diungkap

2. Manfaat bagi institusi

Hasil penelitian dapat menginisiasi pengembangan forensik molekuler untuk mensukseskan road map penelitian forensik dari basic keilmuan hingga hilirisasi produk rapid kit test.

3. Manfaat bagi Pengembangan Ilmu Pengetahuan

Penelitian ini menjadi wadah peneliti untuk meningkatkan kapasitas keilmuan dan melakukan kerjasama penelitian dalam dan luar negeri untuk memperkuat penelitian forensik molekuler.

1.5 Orisinalitas penelitian

Penelitian tentang level ekspresi biomarker mRNA pada luka iris antemortem dan perimortem otot yang diperiksa pada periode postmortem interval khususnya kombinasi biomarker troponin I, tPA, MCP 1 dan HMGB 1 belum pernah dilakukan sebelumnya sehingga penelitian ini merupakan penelitian yang pertama. Penelitian yang mengkaitkan variabel RNA dengan intravitalitas masih jarang, hal ini dapat ditunjukkan dengan diagram Bibliometrik oleh aplikasi *VOSviewer* dengan kata kunci : vital reaction, RNA, forensik sebagai berikut : berdasarkan skala kebaruan tema ditunjukkan dengan warna kuning yang menggambarkan bahwa tema ini baru, sedangkan berdasarkan densitas tema ditunjukkan dengan warna kebiruan yang menggambarkan bahwa tema tersebut belum terang benderang sehingga memerlukan penelitian lebih lanjut.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Epidemiologi Luka Mekanik

Beberapa data epidemiologi trauma dapat disajikan berikut ini, yaitu: trauma tajam (penetrating injury) merupakan sekitar 2% dari semua pasien trauma yang dirawat di *Radboud University Medical Center* di Nijmegen dan *VU University Medical Center* Amsterdam. Pasien sebagian besar laki-laki (83,1%) dan usia rata-rata adalah 36 tahun. Sebagian besar cedera disebabkan oleh penusukan (51,1%) diikuti oleh penembakan (26,3%).³⁵ *Regional emergency center Wonju Severance Christian Hospital* Korea mendapatkan pasien trauma 17.007 dari Januari 2010 hingga Desember 2012 dengan sebaran Usia rata-rata pasien adalah 35,2 tahun. Mekanisme trauma yang paling sering cedera tumpul (90,8%), serta cedera terpeleset dan jatuh, kecelakaan kendaraan bermotor, dan lain-lain. Tempat trauma utama yang paling umum di ekstremitas (38,4%), diikuti oleh craniocerebral, abdominopelvis, dan thorax.³⁶

Trauma benda tajam adalah metode pembunuhan yang umum. Senjatanya biasanya pisau yang mudah diakses dan tidak membutuhkan keahlian khusus untuk menggunakannya. Telah terjadi 471 pembunuhan dengan kekerasan di Denmark selama 1992–2016. Dada kiri depan adalah area yang paling sering terkena trauma benda tajam. Pada 18,9% korban, hanya ada satu cedera benda tajam. 67% korban adalah laki-laki.³⁷ 53 pembunuhan dengan trauma tumpul selama periode 1982 hingga 2012, mewakili 16% dari semua pembunuhan yang ditangani oleh *University Institute of Forensic Kedokteran* di Brescia (Italia utara). 57% (30 kasus) dari korbannya adalah laki-laki. Usia rata-rata para korban adalah 47,9 tahun.³

2.2 Fase penyembuhan luka

Tubuh kita menangani kerusakan jaringan dengan mengaktifkan sistem kekebalan tubuh sebagai respons terhadap molekul intraseluler yang dilepaskan oleh jaringan yang terluka yang disebut *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Prosesnya sama dengan dengan cara mendeteksi molekul patogen yang dikenal sebagai *pathogen-associated molecular patterns*.³⁸ DAMPs adalah molekul endogen yang dilepaskan dari sel yang rusak atau sekarat akibat stres seluler atau cedera jaringan dan dianggap sebagai sinyal bahaya endogen yang selanjutnya menginduksi respon inflamasi pada sistem kekebalan bawaan (*innate immune system*) dengan berinteraksi dengan *pattern recognition receptors* (PRRs) seperti *Toll-like receptors* (TLRs).³⁹

DAMPs dilepaskan dari ruang ekstraseluler atau intraseluler setelah cedera jaringan atau kematian sel yang akan dikenali oleh makrofag dan memicu respons inflamasi dari jalur-jalur yang berbeda termasuk jalur TLRs dan *inflammasome*. DAMPs dapat berasal dari berbagai sumber yang berbeda, antara lain: yang termasuk protein ekstraseluler, seperti biglycan dan tenascin C, sedangkan yang termasuk protein intraseluler seperti *high-mobility group box 1* (HMGB1), *histones*, protein S100, *heat-shock proteins* (HSPs) dan protein plasma semisal fibrinogen, Gc-globulin, dan serum amyloid A (SAA).³⁹

Luka didefinisikan sebagai gangguan fungsional morfologis dari kontinuitas struktur jaringan.¹³ Luka dapat berkisar dari yang sederhana berupa kerusakan integritas epitel kulit atau bisa lebih dalam yang meluas ke jaringan subkutan dengan kerusakan lainnya struktur seperti tendon, otot pembuluh darah, saraf, organ parenkim dan bahkan tulang. Luka dapat timbul dari proses patologis yang dimulai dari dalam maupun luar organ yang terluka. Demikian juga, luka dapat terjadi karena kecelakaan, kesengajaan dan sebagai hasil akhir dari suatu penyakit. Luka, apapun penyebabnya dan apapun bentuknya, merusak jaringan dan mengganggu lingkungan lokal di dalamnya.

Respon fisiologis terhadap benda yang berbahaya adalah perdarahan, kontraksi pembuluh darah, pembekuan darah, aktivasi komplemen dan respon inflamasi. Penyembuhan luka yang normal berlangsung dinamis dan rumit karena proses berlangsung saling berkaitan baik proses perdarahan, pembekuan darah, inisiasi respon peradangan akut di area luka, regenerasi, migrasi dan proliferasi jaringan ikat dan sel parenkim seperti sintesis protein matriks ekstraseluler, remodeling parenkim baru maupun jaringan ikat longgar serta deposit kolagen. Pada akhirnya, proses perbaikan luka berakhir dengan penyambungan jaringan yang terputus. ⁴⁰

Penyembuhan luka dimulai dari migrasi suatu populasi sel, matriks ekstraseluler dan aksi dari mediator mediator terlarut. Proses yang dijelaskan di atas melibatkan : mediator inflamasi dan growth factors, sel sel dan sel matriks ekstraseluler untuk proses proliferasi sel, migrasi dan diferensiasi sel, peristiwa yang melibatkan proses epitelisasi, fibroplasia, angiogenesis, kontraksi luka dan remodeling. ¹⁷

Terdapat 4 fase penyembuhan luka, yaitu : koagulasi dan haemostatis, yang dimulai segera setelah adanya injury, inflamasi yang dimulai segera setelah proses pertama diatas, proliferasi yang dimulai dalam beberapa hari dari perlukaan yang akan membutuhkan waktu terlalu lama dalam proses penyembuhan luka, dan terakhir adalah remodeling luka yang berupa pembentukan jaringan parut yang bisa berlangsung dalam setahun bahkan lebih dari setahun. ¹⁵

2.2.1 Koagulasi dan haemostasis

Segera setelah terjadinya luka, koagulasi dan haemostasis berlangsung pada luka. Prinsip utama dari proses ini adalah mencegah pengeluaran darah. Ini merupakan cara untuk melindungi system vaskuler, menjamin tetap intake/utuh, sehingga fungsi organ vital tidak akan terganggu akibat luka tersebut. Fungsi yang lebih jangka panjang adalah menyediakan matriks yang dibutuhkan sel-sel yang akan migrasi ke area luka pada fase inflamasi. Keseimbangan sel endothelial, trombosit,

koagulasi dan fibrinolysis mengatur haemostasis dan menentukan jumlah fibrin yang akan menutup area luka. ^{11,17}

Bersamaan dengan proses haemostasis, cascade koagulasi diaktifasi baik jalur ekstrinsik maupun jalur intrinsik yang menghasilkan agregasi trombosit dan pembentukan bekuan darah sehingga mencegah perdarahan. Ketika darah tumpah ke area luka, komponen darah dan trombosit bersinggungan dengan matriks kolagen dan matriks ekstraseluler lainnya. Kontak ini menyebabkan dilepaskannya faktor pembekuan darah dari trombosit dan dibentuk bekuan darah yang terdiri dari fibronectin, fibrin, vitronectin, thrombospondin. Bekuan darah dan trombosit yang terperangkap didalam bekuan darah tidak hanya penting dalam haemostasis, bekuan darah juga berguna menyediakan matriks khusus untuk migrasi sel pada fase haemostasis berikutnya dan fase inflamasi. Sitoplasma dari trombosit diisi oleh growth factor dan cytokines seperti *platelet derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor- β* (TGF- β), *epidermal growth factor and insulin-like growth factors*. molekul molekul ini berperan sebagai pemantik cascade penyembuhan luka dengan mengaktifasi dan menarik migrasi sel netrofil, kemudian selanjutnya makrofag, sel endothelial dan fibroblast. Trombosit juga mempunyai vasoaktif amine seperti serotonin yang akan menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah yang menimbulkan ekstrasvasi cairan sehingga terjadilah edema. Eicosanoids dan produk arachidonic acid lainnya dilepaskan ke membrane sel yang berpotensi dalam respon inflamasi. ^{11,17}

2.2.2 Fase Inflamasi

Fase inflamasi meliputi fase humoral dan seluler yang bertujuan sebagai barrier invasi mikroorganisme. Fase inflamasi dibagi menjadi 2 fase, yaitu : fase inflamasi awal dan fase inflamasi lanjut. Fase inflamasi awal dimulai pada akhir fase koagulasi yang mempunyai banyak fungsi untuk mengaktifasi cascade complement dan memulai proses molekuler yang terutama ditandai dengan infiltrasi netrofil yang akan mencegah

infeksi. Neutrophil akan memfagositosis dan memusnahkan bakteri, benda asing dan sel mati. Neutrofil mulai tertarik ke area luka dalam waktu 24-36 jam setelah dilepaskannya banyak agen kemoatraktif termasuk TGF B, komponen complement seperti C3a dan C5a serta formylmethionyl peptides yang dihasilkan oleh bakteri dan trombosit. ^{11,17}

2.2.3 Fase proliferasi

Setelah area luka bersih dari bakteri dan kuman oleh sel darah putih, selanjutnya, sel darah merah yang kaya akan oksigen datang ke area tersebut untuk membangun jaringan baru yang disebut jaringan parut. Tahap ini disebut sebagai fase proliferasi. Oksigen yang dibawa oleh sel darah merah juga akan membantu pembentukan jaringan yang baru. Tubuh juga akan mulai memproduksi kolagen, yang berperan sebagai penyangga untuk jaringan yang sedang diperbaiki. Proses ini akan membuat bekas luka yang awalnya terlihat berwarna kemerahan, lalu lama-kelamaan memudar. ¹⁷

2.2.4 Proses penguatan jaringan/maturasi

Proses penyembuhan luka yang terakhir atau fase maturasi adalah untuk menguatkan jaringan yang baru terbentuk. Bekas luka terlihat seperti kulit yang ditarik melebar. Itu adalah salah satu usaha tubuh agar jaringan kulit yang baru benar-benar kuat di tempatnya. Penyembuhan total bisa memakan waktu beberapa hari, minggu, atau bahkan tahun. Saat sudah sembuh total, maka jaringan tersebut akan kembali sekuat sebelumnya, saat sebelum mengalami perlukaan. ¹⁷

2.3 Peran tPA, MCP 1 dan HMGB1 dalam proses penyembuhan luka

2.3.1 t plasminogen activator

Plasminogen activator merupakan kelompok enzim dalam keluarga protease serin yang berperan penting dalam homeostasis darah (koagulasi/fibrinolisis) dan regulasi matriks, memodulasi respons inflamasi

terhadap cedera jaringan dalam berbagai model, dan sebagai sitokin untuk memicu sinyal intraseluler yang dimediasi oleh reseptor. tPA adalah glikoprotein dengan berat molekul 69-kDa yang terdiri dari 527 atau 530 asam amino, disintesis di dalam sel dan dilepaskan sebagai enzim rantai tunggal, yang selanjutnya dipecah oleh plasmin menjadi menjadi bentuk dua rantai (rantai berat dan rantai ringan). tPA rantai tunggal berisi 4 domain, yaitu : domain jari (F), yang homolog dengan domain fibronektin; 2) sebuah domain EGF, yang homolog dengan EGF; 3) dua domain kringle (K); dan 4) domain katalitik protease (P). Rantai berat dari dua rantai tPA berisi domain F, EGF, dan K, sedangkan rantai ringan mengandung domain P.²⁴

Meskipun tPA umumnya dianggap sebagai enzim protease dari keluarga protease serin yang poten, semakin banyak bukti menunjukkan bahwa tPA juga memiliki berbagai fungsi yang terpisah dari aktivitas proteolitiknya, namun memiliki peran penting dalam berbagai pengaturan fisiologis dan patologis tubuh. Sehingga dapat dikatakan bahwa tPA merupakan molekul yang berfungsi hybrid dengan dua peran yaitu sebagai sitokin dan enzim katalitik. Sebagai protease serin, tPA memainkan peran penting dalam homeostasis (pembekuan darah/fibrinolisis) dan regulasi matriks ekstraseluler. Sebagai sitokin, tPA melakukan beberapa aktifitas dengan membuat pengikatan dengan reseptornya di membran sel dan memicu sinyal intraseluler lebih lanjut.²⁴

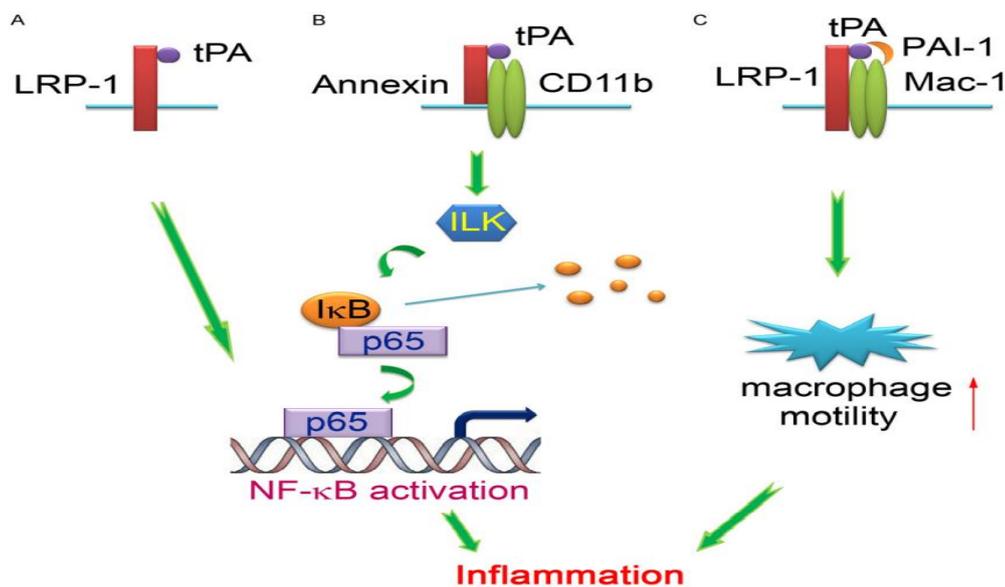
tPA tidak memiliki reseptor yang spesifik, namun penelitian yang ada telah mengidentifikasi reseptor yang mempunyai kemampuan secara fungsional dan biologis sebagai reseptor tPA dengan memulai pensinyalan intraseluler dan memediasi respons seluler hilir adalah LDL receptor-related protein-1 (LRP-1), yang awalnya diidentifikasi sebagai reseptor tPA pada hepatosit dan annexin A2, yang awalnya ditemukan pada mikroglia.²⁴

tPA memiliki implikasi luas dalam meningkatkan modulasi infiltrasi sel-sel radang pada proses inflamasi di organ-organ tubuh. Peningkatan infiltrasi inflamasi disertai dengan induksi tPA secara bersamaan yang menunjukkan bahwa tPA mungkin merupakan faktor endogen umum yang

memodulasi infiltrasi dan respons inflamasi di berbagai sistem organ. Contohnya : pada cedera otak akut, tPA berperan memediasi akumulasi dan aktivasi makrofag F4/80 di otak yang iskemik, tPA mendorong infiltrasi makrofag atau leukosit lain pada cedera ginjal akut kronis. ²⁴

Aktivasi NF- κ B merupakan peristiwa sentral dalam inisiasi dan progresi inflamasi. Terdapat lima jenis NF- κ B , yaitu : p50, p52, p65 (RelA), RelB, dan c-Rel. Dalam status fisiologis, NF- κ B dipertahankan dalam sitoplasma oleh penghambat spesifiknya yaitu I κ B. Setelah aktivasi, I κ B akan menjadi terfosforilasi, yang menyebabkan degradasi, menghasilkan pelepasan dan translokasi inti p65/p50 (aktivasi kanonik) atau RelB/p52 (aktivasi non-kanonik), dan selanjutnya pengikatan DNA dan transkripsi gen. Peran tPA dalam aktivasi NF- κ B antara lain dapat mendorong fungsi spesifik biologis sel dengan berikatan dengan reseptor membran (LRP-1 atau annexin A2) dan memulai peristiwa berbagai pensinyalan intraseluler.

24



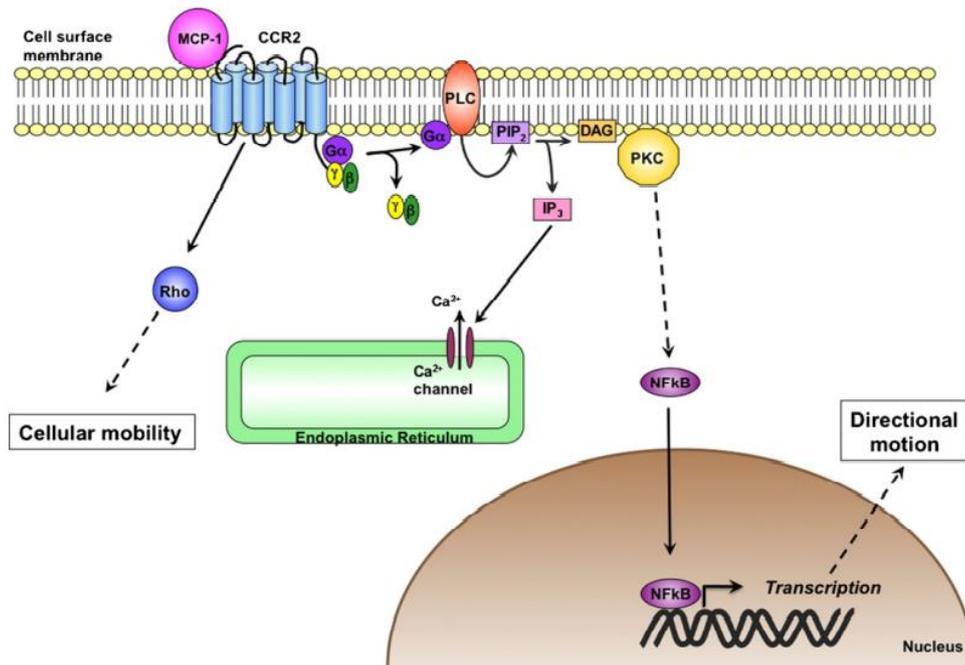
Gambar 3. Mekanisme tPA dalam Memodulasi Peradangan.

A: tPA mengikat LRP-1 dan menginduksi aktivasi NF- κ B. B: tPA mempromosikan agregasi annexin A2 dan integrin CD11b, yang mengarah ke aktivasi ILK, fosforilasi dan degradasi I κ B, dan akhirnya aktivasi NF- κ B. C: tPA membentuk kompleks dengan LRP-1, PAI-1, dan Mac-1, yang menghasilkan peningkatan migrasi makrofag. Dikutip dari Ling Lin, Kebin Hu²⁴

2.3.2 MCP 1

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) adalah chemoattractant kuat untuk monosit dan makrofag ke area inflamasi. MCP-1 adalah molekul kelas C–C dari keluarga beta chemokine dan salah satu faktor kunci yang terlibat dalam inisiasi peradangan. Perannya adalah memicu kemotaksis dan migrasi transendotel monosit ke lesi inflamasi dengan berinteraksi dengan membran CC reseptor kemokin 2 (CCR2) dalam monosit. MCP-1 disekresikan oleh fibroblas, sel endotel, sel otot pembuluh darah halus, monosit, sel T, dan jenis sel lain yang memediasi masuknya sel ke tempat peradangan. ²⁶

MCP-1 adalah anggota kelas C–C dari keluarga beta kemokin yang biasanya disekresikan dalam dua bentuk utama (dengan molekul bobot 9kDa dan 13 kDa) sebagai hasil dari *O-glikosilasi*. Fungsi MCP-1 adalah sebagai kemoattractan kuat untuk monosit, tetapi juga penting untuk memori T limfosit dan sel natural killer (sel NK). Selanjutnya, bersama dengan interleukin-8 (IL-8), MCP-1 telah terbukti memicu adhesi kuat monosit ke endotelium pembuluh darah. Ekspresi MCP-1 tampaknya menjadi komponen penting dalam ekstravasasi monosit melalui endotel vaskular. ²⁶



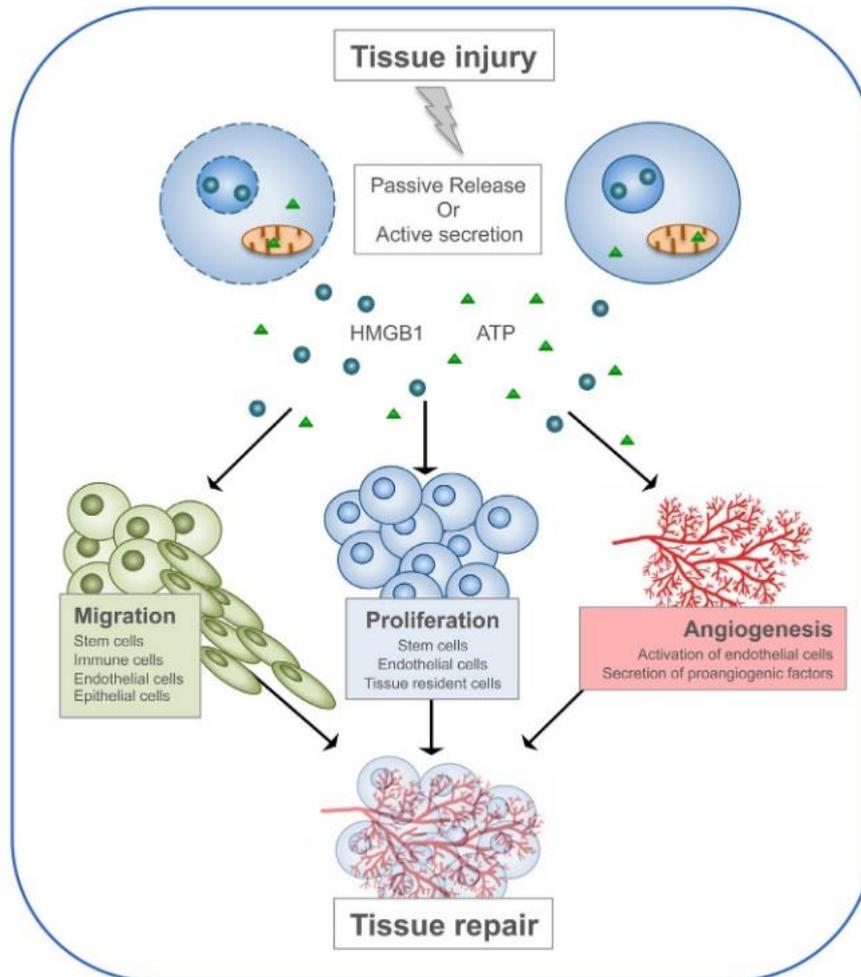
Gambar 4. Ikhtisar jalur pensinyalan yang diaktifkan pada ligasi MCP-1 ke CCR2. Aktivasi protein G menginduksi jalur PLC-IP₃ yang menghasilkan pelepasan kalsium intraseluler. Selain menginduksi IP₃, PLC menyebabkan aktivasi PKC yang mengaktifkan NF-κB. NF-κB meningkatkan regulasi beberapa gen yang menghasilkan pergerakan sel (directional motion). Rho juga diaktifkan, yang menghasilkan induksi mobilitas sel. Dikutip dari Esther Melgarejo et.al.²⁶

2.3.3 HMGB 1

HMGB1 adalah sebuah protein kromosom non-histone yang dapat mengikat *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) dan berperan sebagai mediator inflamasi. HMGB1 atau amphoterin telah dipelajari secara luas sebagai transkripsi faktor (transcription factor) dan faktor pertumbuhan (growth factor). Studi terbaru menyebutnya sebagai mediator inflamasi lanjut (late inflammatory mediator). HMGB1 disekresikan secara ekstraseluler oleh monosit teraktivasi dan makrofag atau dilepaskan secara pasif oleh sel nekrotik atau sel tua. HMGB1 ekstraseluler adalah mediator peradangan yang ampuh dan telah terlibat dalam banyak penyakit radang.²⁵ HMGB1 dapat dilepaskan ke ekstraseluler pada fase akhir peradangan dan sebagai respons terhadap berbagai rangsangan, termasuk lipopolisakarida, tumor nekrosis faktor-α (TNF-α), atau interleukin-1β (IL-1β).⁴¹

HMGB1 ekstraseluler dapat terikat pada beberapa reseptor permukaan sel ,yaitu : *receptor for advanced glycation end products* (RAGE), *toll-like receptor 2* (TLR2), and TLR4 yang mana ikatan tersebut menginduksi reaksi fisiologis maupun respon patologis. Aktivasi RAGE memodulasi beberapa respon seluler penting termasuk peradangan, kekebalan, proliferasi, adhesi seluler, dan migrasi. RAGE merupakan reseptor utama untuk aktivitas proinflamasi HMGB1 dalam makrofag berbagai hewan pengerat. Di kulit, RAGE terdapat pada sel basal epidermis, makrofag, dan fibroblas. Aktivasi dari RAGE menginduksi penurunan regulasi gen yang terlibat dalam sintesis kolagen dan peningkatan regulasi matriks metalloproteinase-8 (MMP-8) dan gen MMP-9.^{25,39,41}

HMGB1 adalah sitokin multifungsi yang terlibat dalam respons inflamasi dan perbaikan jaringan yang terdeteksi di inti sel kulit, dan terakumulasi disitoplasma sel epidermis di kulit yang terluka. HMGB1 memiliki efek kemotaktik pada fibroblas kulit dan keratinocytes.⁴¹



Gambar 5. Tissue Injury

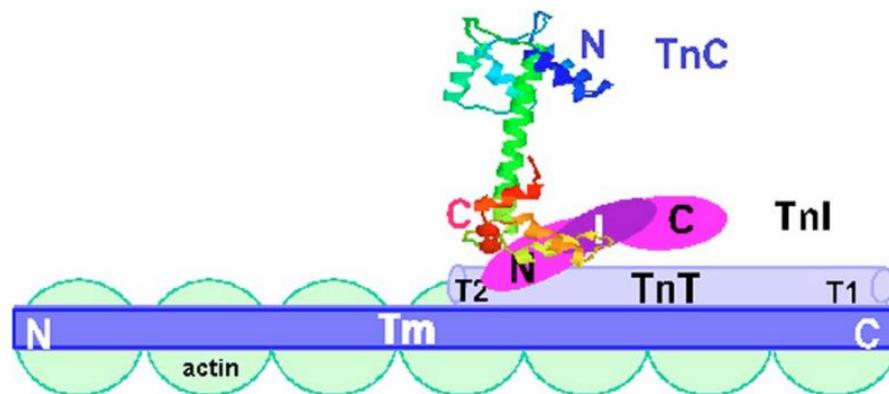
Setelah cedera jaringan, HMGB1 dan ATP dilepaskan secara pasif oleh sel-sel mati atau disekresikan secara aktif oleh sel stres. Kemudian, mereka merekrut sel sel imunitas ke lokasi jaringan yang mengalami kerusakan. Sel-sel kekebalan diperlukan untuk membersihkan luka dengan menelan sel-sel mati dan puing-puing seluler. Kemudian, sel punca dan sel-sel tetangga diinduksi untuk berkembang biak dan membangun jaringan baru, bersama-sama dengan matriks ekstraselulernya. Sel endotel diaktifkan untuk membentuk pembuluh darah.

2.3.4 Troponin I (TnI)

Kontraksi otot lurik diatur oleh konsentrasi Ca^{2+} intrasel melalui filamen tipis protein pengatur troponin (Tn) dan tropomiosin (Tm). Tn terdiri dari tiga subunit yang berinteraksi kuat satu sama lain: troponin C (TnC) yang mengikat Ca^{2+} , troponin I (TnI) dan troponin T (TnT) yang mengikat subunit Tm. Interaksi TnT-Tm, yang spesifik untuk otot lurik, penting untuk pengikatan Tn ke filamen tipis dengan stoikiometri yang tepat 1 Tn : 1 Tm : 7 aktin. Ketiadaan ion Ca^{2+} menyebabkan interaksi aktin dan myosin dan

kontraksi dihambat. Sebaliknya pengeluaran ion Ca^{2+} dari retikulum sarkoplasma menyebabkan TnC mengikat Ca^{2+} menimbulkan sisi dalam domain N-terminal TnC terekspos sehingga TnT, TnI dan TnC saling berinteraksi yang pada akhirnya memicu kontraksi. ⁴²

Troponin I (TnI) adalah subunit penghambatan (*inhibitory*) kompleks troponin dalam filamen tipis sarkomer otot lurik dan memainkan peran sentral dalam regulasi kalsium pada proses kontraksi dan relaksasi otot. TnI vertebrata telah berevolusi menjadi tiga isoform yang dikodekan oleh tiga gen homolog: TNNI1 untuk TnI otot rangka lambat, TNNI2 untuk TnI otot rangka cepat dan TNNI3 untuk TnI jantung. ²³



Gambar 6. Representasi kimia dari filamen tipis unit pengatur TnC, troponin C (N- and C-terminal lobes)TnI, troponin I, main inhibitory region); TnT, troponin T (T1, N-terminal region, T2, C-terminal region); Tm, tropomyosin. Dikutip dari Gomes et al

2.4 Faktor yang Mempengaruhi Penyembuhan Luka

Penyembuhan luka adalah proses biologis yang kompleks yang menghasilkan pemulihan integritas jaringan. Secara fisiologis, dapat dipecah menjadi empat fase yang berbeda yaitu dari hemostasis, inflamasi, proliferasi dan perombakan jaringan/remodelling. ⁴³Penyembuhan luka melibatkan banyak molekul regulator dalam tubuh termasuk sitokin dan factor pertumbuhan (growth factors). Disregulasi dalam sitokin atau

ekspresi faktor pertumbuhan mengubah proses penyembuhan luka normal.

13

Banyak faktor yang mempengaruhi penyembuhan luka, yaitu : ⁴³

1. Nutrisi

Malnutrisi mempengaruhi penyembuhan dengan memperpanjang periode peradangan/inflamasi, menghambat fungsi fibroblas dan mengurangi angiogenesis dan endapan kolagen. Ada banyak nutrisi penting yang penting untuk penyembuhan luka, termasuk vitamin A (terlibat dalam pertumbuhan epidermis), karbohidrat (untuk sintesis kolagen) dan asam lemak omega-(memodulasi jalur asam arakidonat). Di dalam beberapa tahun terakhir penelitian ekstensif di bidang nutrisi klinis telah menunjukkan manfaat yang jelas untuk penggunaan teknologi dukungan nutrisi untuk meningkatkan penyembuhan luka.

2. Hipoksia

Semua luka akan mengalami hipoksia sampai batas tertentu sehingga pasokan nutrisinya terganggu. Sementara tingkat hipoksia diperlukan untuk memfasilitasi re-epitelisasi, oksigen yang cukup merupakan kebutuhan sangat penting untuk menyembuhkan luka. Dalam praktik bedah bahwa pasien lanjut usia dan mereka dengan penyakit pembuluh darah perifer akan memiliki penyembuhan yang buruk, sebaliknya pemberian oksigen hiperbarik akan memperbaiki penyembuhan luka. Meskipun hipoksia adalah salah satu *chemoattractants* untuk neutrofil dan makrofag, oksigen diperlukan untuk memungkinkan fagositosis dan untuk fungsi optimalnya. Pemberian suplementasi oksigen selama masa perioperative mencegah terjadinya infeksi. Oksigen juga penting untuk deposisi kolagen karena bertindak sebagai substrat dalam hidroksilasi residu prolin dan lisin. Merokok mempengaruhi tekanan parsial oksigen dan menyebabkan banyak komplikasi dalam penyembuhan luka terutama melalui mekanisme efek merokok pada viabilitas sel, migrasi dan diferensiasi miofibroblastik.

3. Infeksi

Profilaksis antibiotik sebelum membuat sayatan bedah adalah terbukti mengurangi risiko infeksi luka. Sebaliknya penjahitan luka yang mengalami infeksi akan memperpanjang masa penyembuhan luka.

4. Kondisi immunosupresan

Pasien dengan HIV, kanker, dan malnutrisi memiliki derajat immunosupresi yang dapat menyebabkan tertundanya penyembuhan luka. Selain itu, obat apa pun yang mengganggu respons inflamasi dapat menghambat kaskade penyembuhan luka. Steroid oral, seperti prednisolone, telah terbukti menurunkan konsentrasi sitokin selama perbaikan luka dan menyebabkan berkurangnya deposisi kolagen.

5. Penyakit kronik

Setiap penyakit kronis yang mempengaruhi sistem kardiorespirasi dapat berdampak buruk pada suplai oksigen dan nutrisi lainnya diperlukan untuk penyembuhan luka. Pasien yang menderita diabetes mellitus akan mengalami gangguan penyembuhan luka karena kadar glukosa darah yang lebih tinggi mempengaruhi fungsi leukosit. Ekspresi dan fungsi MMP yang diubah pada diabetes berkontribusi terhadap penyembuhan luka yang buruk berupa komplikasi pada banyak pembuluh darah. Diabetes juga menyebabkan penyakit jangka panjang berupa kerusakan mikrovaskuler yang mempengaruhi tingkat suplai oksigen jaringan dan nutrisi.⁴⁴

6. Usia

Pasien lanjut usia memiliki lapisan epidermis yang lebih tipis dan lebih lambat respon inflamasi, migrasi dan proliferasinya. Usia tua juga lebih mungkin untuk memiliki penyakit kronis, yang berkontribusi untuk membuat pasien ini memiliki penyembuhan luka yang lebih lambat dan karenanya lebih tinggi risiko komplikasi lukanya seperti *dehiscence*.

7. Penanganan luka

Lingkungan luka yang higienis adalah prasyarat untuk penyembuhan luka. Terdapat banyak (250 jenis) pembalut luka yang berfungsi untuk

melindungi luka, membiarkannya tetap lembab dan menyerap eksudat yang berlebihan untuk membantu proses penyembuhan.

8. Genetic

Bekas luka keloid terjadi ketika ada pertumbuhan berlebih dari jaringan parut yang melampaui tepi luka. Kondisi ini terasa sakit dan gatal dan memiliki tingkat kekambuhan yang tinggi tetapi dapat merespon steroid, cryotherapy atau terapi radiasi. Kondisi ini paling sering terjadi di bahu, lengan atau dada bagian atas dan jarang di bawah pinggang. Ada komponen genetik yang kuat untuk perkembangan keloid, secara signifikan lebih umum pada pasien kulit hitam, Hispanik atau ras Asia.

9. Teknis operasi

Teknik bedah/operasi jelas sangat vital dalam mengoptimalkan penyembuhan luka. Penanganan jaringan yang hati-hati, teknik aseptik yang ketat, hindari ketegangan di seluruh luka dan pilihan jahitan semuanya akan berkontribusi untuk meminimalkan komplikasi luka. Hipotermia intraoperative harus dihindari dan oksigen tambahan harus diberikan setelah operasi untuk mengurangi komplikasi infeksi.

2.5 Umur luka

Umur luka adalah waktu yang dihitung dari saat terjadinya luka hingga waktu pemeriksaan. Hal-hal yang penting ditanyakan terkait umur luka adalah luka yang manakah yang disebabkan oleh perlakuan orang lain, luka-luka manakah yang merupakan luka premortem, *agony*/perimortem dan postmortem, berapa lama korban bertahan hidup sejak terjadinya luka-luka, dan luka-luka manakah yang menyebabkan kematian.¹¹

Umur luka dapat dievaluasi dengan menggunakan pemeriksaan morfologi, sitologi, dan biologi molekuler. Umumnya, selama beberapa menit pertama setelah terjadinya luka, pemeriksaan mikroskopis tidak dapat memverifikasi apakah luka terjadi sebelum atau sesudah kematian. Namun, kadar mRNA sitokin dan enzim biasanya berubah lebih cepat daripada kadar protein dan histomorfologi setelah terjadinya luka.¹³Hingga saat ini dilakukan penelitian untuk mengetahui perubahan molekuler di tepi luka-

luka dengan imunohistokimia dan *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT PCR).^{11, 13}

Sejumlah biomarker yang terlibat dalam reaksi vital dilaporkan meningkatkan akurasi perkiraan usia luka. Sampai saat ini belum ada parameter yang telah mapan untuk memperkirakan umur luka karena spesifisitas dan reliabilitas yang rendah, dan keterbatasan teknis pemeriksaan yang digunakan. Oleh karena itu diperlukan kriteria yang spesifik dan sistematis untuk menemukan biomarker dengan memakai teknis pemeriksaan yang canggih. Elaborasi beberapa biomarker akan meningkatkan akurasi dan objektifitas hasil perkiraan umur luka.¹¹

Umur luka diklasifikasikan menjadi 2, yaitu : umur luka baru yaitu luka yang diperkirakan terjadi kurang dari 6 jam, sedangkan umur luka lama adalah luka yang diperkirakan terjadi lebih dari 6 jam. Batas antara kedua umur luka tersebut adalah ada tidaknya infiltrasi sel-sel netrofil di area luka yang dapat diperiksa dengan pemeriksaan histologi konvensional. Pada luka baru telah terjadi rangkaian proses inflamasi berupa pelepasan-pelepasan mediator inflamasi yang merupakan biomarker penting dalam penelitian umur luka. Biomarker umur luka pada organ kulit dan musculoskeletal yang telah diteliti oleh para ahli terangkum dalam table berikut ini :¹¹

Biomarkers	Post-traumatic interval																
	0h	1h	6h	12h	16h	24h	36h	48h	3d	5d	7d	9d	14d	17d	21d		
Histology																	
MGL ⁺ /MPO ⁺																	
MGL ⁺ /I4/80 ⁺																	
MGL ⁺ /α-SMA ⁺																	
CD14 ⁺ /CD32b ⁺ /CD68 ⁺																	
CD14 ⁺ /CD32b ⁺ /CD68 ⁺																	
CD14 ⁺ /CD32b ⁺ /CD68 ⁺																	
CD68 ⁺ /MMP-2 ⁺																	
CD68 ⁺ /MMP-9 ⁺																	
Pax7 ⁺ /MyoD ⁺																	
Nrf2 ⁺ /MPO ⁺																	
Nrf2 ⁺ /MAC387 ⁺																	
Nrf2 ⁺ /α-SMA ⁺																	
pro-col 1 ⁺ /α-SMA ⁺																	
CD45 ⁺ /pro-col 1 ⁺ /α-SMA ⁺																	
FVlltra/CD15/tryptase																	
CD34 ⁺ /Flk-1 ⁺																	
M3R ⁺ in neutrophil																	
M3R ⁺ in MNCs, FBCs																	
M3R ⁺ in FBCs																	
SP ⁺																	
CB1R ⁺ in MNCs																	
CB1R ⁺ FBCs																	
caspase-3 ⁺ , TLR4 ⁺																	
α7nAChR																	
caspase-1																	
Protein																	
Pax7, MyoD																	
CB2R																	
pro-col IIIa1																	
IL-6, VEGF-α																	
pro-col Ia2																	
MGL																	
LC3-I, LC3-II, p62																	
M3R																	
ICAM																	
α7nAChR																	
FZD4																	
p-CB1R																	
Gene																	
Pax7, MyoD																	
MCP-1, IL-1β, TNF-α																	
CXCL12																	
MGL																	
Tn I																	
SNAT2																	
IFN																	
ASCT2																	
SECTA1																	
IL-6, IL-7, IL-8, CXCL5, CCL4																	
Cygb																	
SFRP5																	
ASL																	
FZD4																	
CDXBC																	
α7nAChR																	
MMP-2, TIMP-2																	
MMP-9/MMP-2																	
IL-6, IL-6, TNF-α, IFN-γ																	
MCP-1																	
VEGF																	
MMP-2, MMP-13, Type I																	
MMP-9																	

Tabel 1. Biomarker pada cedera jaringan musculoskeletal
Dikutip dari Na Li et.al

Deteksi vitalitas luka terutama ketika luka yang ditimbulkan sangat dekat dengan waktu kematian merupakan salah satu masalah yang paling menantang dalam patologi forensic. Dalam kondisi ini, perubahan makroskopis maupun mikroskopis pada luka tidak dapat dideteksi dengan jelas karena lukanya bertahan dalam waktu singkat sebelum kematian

korban.^{45,19} Dengan kata lain bahwa dalam menit atau jam pertama, standar pemeriksaan histologis mungkin tidak menentukan apakah luka itu ditimbulkan pada periode sebelum atau sesudah kematian. Infiltrasi sel darah merah pernah dianggap sebagai tanda reaksi vital, namun beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa ekstrasvasi sel darah juga dapat terjadi setelah kematian dan tidak dapat digunakan sebagai penanda yang dapat diandalkan dalam diagnosis vitalitas luka. Selain itu, pemeriksaan kadar protein menggunakan teknik saat ini juga tidak efektif karena kadar protein bisa menjadi terlalu rendah di menit pertama setelah terjadinya luka.

18

Selain itu, adanya infiltrasi neutrofil polimorfonuklear dikenal sebagai satu-satunya kriteria histologis yang dapat diandalkan untuk membedakan luka-luka ante-mortem dari luka post-mortem, namun hal ini masih merupakan tantangan tersendiri khususnya pada cedera yang terjadi sesaat menjelang kematian. Infiltrasi neutrofil polimorfonuklear bervariasi dari hitungan menit hingga jam yang dipengaruhi oleh banyak factor seperti usia, penyakit, atau obat-obatan. Dengan demikian, pemeriksaan histologis menjadi tidak sensitive pada *survival time* yang singkat.¹⁹

Beberapa penelitian yang telah membuktikan adanya perubahan biomarker mRNA dalam fase awal luka, yang mana pemeriksaan dilakukan pada periode setelah kematian, antara lain : penelitian menggunakan *mouse* dan jaringan kulit postmortem manusia menunjukkan bahwa deteksi kadar mRNA *activating transcription factor 3* (ATF3) berguna untuk penentuan vitalitas luka memar (contusion) berusia 30 menit. Peningkatan ATF3 di tingkat mRNA juga dapat dideteksi hingga 96 jam dan 48 jam setelah kematian.⁴⁵ *Interleukin-1 β immunostaining* pada sel epidermis dapat membedakan gantung antemortem-postmortem. Pengecatan interleukin 1 β tersebut tampak jelas setelah 2 jam antemortem dan semakin menurun pada 24 jam antemortem. Tidak ditemukan interleukin 1 β tersebut pada sampel postmortem.⁴⁶ Pemeriksaan RT PCR *mRNA Interleukin-1 β* menunjukkan over ekspresi pada sekitar 30 menit setelah trauma, dan mengalami kadar puncak pada 2 jam setelah trauma.⁴⁷

Sebuah penelitian menyelidiki ekspresi mRNA dan kadar protein *C-X-C motif chemokine ligand 1* (CXCL1) dan *C-X-C motif chemokine receptor 2* (CXCR2) pada luka memar pada kulit tikus dan dibandingkan dengan control pada kulit manusia. Analisis western blot dari protein CXCL1 dan CXCR2 menunjukkan tidak ada perbedaan antara kulit yang terluka dan kulit yang utuh. Namun, level mRNA menunjukkan ekspresi yang lebih tinggi CXCL1 dan CXCR2 pada kulit tikus dan manusia yang memar, dibandingkan dengan kulit utuh. Tidak ditemukan perubahan kadar mRNA CXCL1 dan CXCR2 pada kulit tikus yang memar pada periode postmortem. Peningkatan ekspresi mRNA dapat diamati pada luka memar kulit tikus dari 30 menit paska trauma hingga 96 jam dan 72 jam setelah kematian masing-masing untuk CXCL1 dan CXCR2. ⁴⁸

Penelitian lainnya dengan menggunakan pemeriksaan *quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-qPCR) pada kulit tikus dan manusia yang menderita luka memar menunjukkan level mRNA IL-6 dan IL-10 meningkat dibandingkan dengan kulit yang utuh. Ekspresi mRNA IL-6 dan IL-20 tersebut dapat diamati dari 30 menit paska trauma sampai 72 jam setelah kematian. ⁴⁹

2.6 Lama waktu kematian

Lama waktu kematian adalah waktu yang dihitung dari saat terjadinya kematian hingga saat pemeriksaan. Dalam rentang waktu kematian tersebut akan terjadi perubahan-perubahan pada tubuh seperti perubahan fisik (*algor mortis*, *livor mortis*), fisikokimia (*rigor mortis*), biokimia (konsentrasi elektrolit, aktivitas enzim), mikrobiologis (penguraian), entomologis dan proses botani lainnya. ²⁸

Waktu kematian dikategorikan menjadi 2, yaitu: waktu kematian awal (*early postmortem interval/EPMI*) dan waktu kematian lanjut (*late postmortem interval/LPMI*). Waktu kematian awal merupakan periode waktu kurang dari 24 jam yang mana tanda-tanda pembusukan jenazah belum terlihat jelas sehingga para saksi mata masih dapat mengidentifikasi jenazah secara kasat mata dan para investigator masih dapat lebih banyak

mengumpulkan barang bukti pada jenazah, sedangkan waktu kematian lanjut adalah waktu kematian di atas 24 jam yang mana telah tampak jelas pembusukan jenazah.³²

Perkiraan waktu kematian dapat dilakukan dengan pemeriksaan kaku mayat, lebam mayat, pembusukan, penurunan suhu tubuh. Selain itu, para ahli menggunakan parameter histologis, biokimia dan terakhir degradasi mRNA untuk mendapatkan hasil perkiraan umur luka yang lebih akurat.

Penentuan *postmortem interval* (PMI) secara molekuler dilakukan berdasarkan degradasi RNA⁵⁰ dan ekspresi gen.⁵¹ RNA akan mengalami degradasi sekitar 21% dalam 24 jam EPMI. ⁵⁰Ekspresi gen akan berbeda beda dalam periode EPMI karena setiap jenis sel akan diatur regulasi survivalnya oleh gen tertentu sehingga setiap sel menunjukkan daya tahan yang berbeda-beda terhadap kondisi kekurangan oksigen. Gen yang terkait dengan kelangsungan hidup, stres, epigenetik dalam pewarisan, regulasi perkembangan sel, dan tumor diekspresikan secara berbeda setelah kematian. Degradasi mRNA tidak signifikan selama tahap awal kematian/EPMI, melainkan terjadi degradasi mRNA secara bertahap pada periode LPMI. Oleh karena itu, ekspresi gen berkontribusi signifikan terhadap konten RNA pada periode EPMI. ⁵¹

Perkiraan PMI dengan mempelajari degradasi RNA dapat dilakukan karena degradasi RNA atau hilangnya transkrip RNA setelah kematian tampaknya cepat terjadi dan proses ini bergantung pada waktu. Setelah kematian RNA terdegradasi oleh ribonuklease yang sudah ada di dalam sel dan/atau berasal dari bakteri atau pencemaran lingkungan lainnya. Faktor fisik dan faktor kimia yang tidak spesifik menambah efek ini. Konsep dari kuantifikasi mRNA atau degradasi DNA sebagai kemungkinan indikator interval post mortem telah disajikan oleh beberapa peneliti. ²⁸

Biomarker mRNA yang pernah diteliti untuk waktu kematian adalah LCE1C pada kulit, Cdc25b pada jantung.³¹ mRNA *Ninj2*, *Griffin*, *Hopx* and *Arpp19* pada otak. ³²mRNA tersebut merupakan biomarker waktu kematian awal. Sedangkan mRNA berikut ini merupakan biomarker waktu kematian

lanjut, yaitu : miRNAs and circRNAs seperti miR-122, miR-133a dan 18S pada jantung; LC-Ogdh, circAFF1 dan miR-122 di hati; serta miR-133a, circ-AFF1 di jaringan otot dan kulit.

2.7 RNA

Penggunaan RNA di bidang forensic

Dengan kematangan perhitungan qPCR, kuantifikasi RNA telah dilakukan secara luas digunakan di bidang patologi forensic untuk memperkirakan penyebab kematian (COD), waktu cedera (time of injury), patofisiologi proses kematian, dan estimasi PMI.^{52,53} qPCR adalah kombinasi dari amplifikasi DNA dan analisis pasca-PCR yang memantau jumlah DNA yang diamplifikasi di setiap siklus PCR.⁵⁴ Kecepatan, kepekaan, kesederhanaan, dan persyaratan ukuran sampel kecil memecahkan masalah teknis perkiraan PMI.³²

Stabilitas RNA

Setelah kematian, RNA akan mengalami degradasi oleh enzim ribonuclease yang banyak terdapat didalam sel, selain itu juga degradasi tersebut disebabkan oleh aktivitas bakteri, factor fisik dan kimia. Kondisi agonal seperti koma dan hipoksia diduga juga mempengaruhi stabilitas RNA. Organ-organ tubuh mempunyai RNA yang stabilitasnya berbeda beda, contohnya: RNA pada organ pankreas dan hati lebih cepat mengalami degradasi, sedangkan otak, paru-paru fetus dan neonates, retina, tulang dan darah lebih lama mengalami degradasi. RNA postmortem diatas 96 jam masih dapat diekstraksi dan dapat dikuantifikasi dengan RT PCR meskipun sudah ditemukan degradasi dan fragmentasi RNA. Aplikasinya dibidang Forensik adalah kemungkinan dapat menjadi metode diagnostic untuk menilai derajat dan lama seseorang mengalami kondisi agoni, sebab kematian dan lama waktu menuju waktu kematian.²⁷

2.8 Permodelan Sistem Dinamis

Secara umum dapat dijelaskan bahwa suatu sistem diartikan sebagai sesuatu yang berisikan sekumpulan komponen/elemen yang saling berkaitan sehingga dapat saling mempengaruhi satu sama lainnya hingga dihasilkan suatu output. Salah satu pendekatan yang digunakan untuk mengatasi permasalahan dalam suatu system adalah dengan *system thinking* untuk mengetahui apa yang sebenarnya terjadi dengan memahami 5 elemen kunci dalam *system thinking* tersebut, yaitu : output (yang menjadi tujuan/diharapkan), *feedback-loop* (proses-proses yng terjadi dalam system), input (status,posisi atau kondisi saat ini), *throughput* (status transisi), dan lingkungan. ^{33,34}

Permodelan dibidang Kesehatan telah dikerjakan untuk berbagai keperluan, yaitu permodelan tentang penyakit, permodelan organisasi, dan pemodelan kesehatan regional. Dengan permodelan tersebut dapat diketahui tren dan pendekatan utama dalam mengatasi permasalahan penyakit, organisasi sarana Kesehatan dan sistem Kesehatan. ⁵⁵

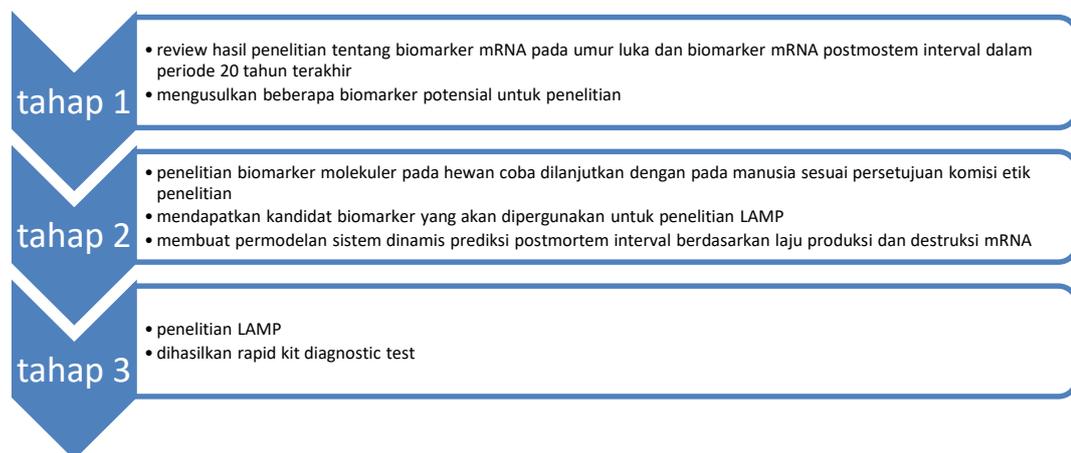
Aplikasi POWERSIM adalah salah satu aplikasi computer yang dipergunakan untuk melakukan permodelan dalam system dinamis. ⁵⁶ Permodelan tersebut selanjutnya memerlukan kalibrasi dengan kasus nyata hingga diperoleh permodelan yang sama atau mendekati keadaan nyata. ⁵⁵

BAB III

KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP

3.1 Rencana road map penelitian

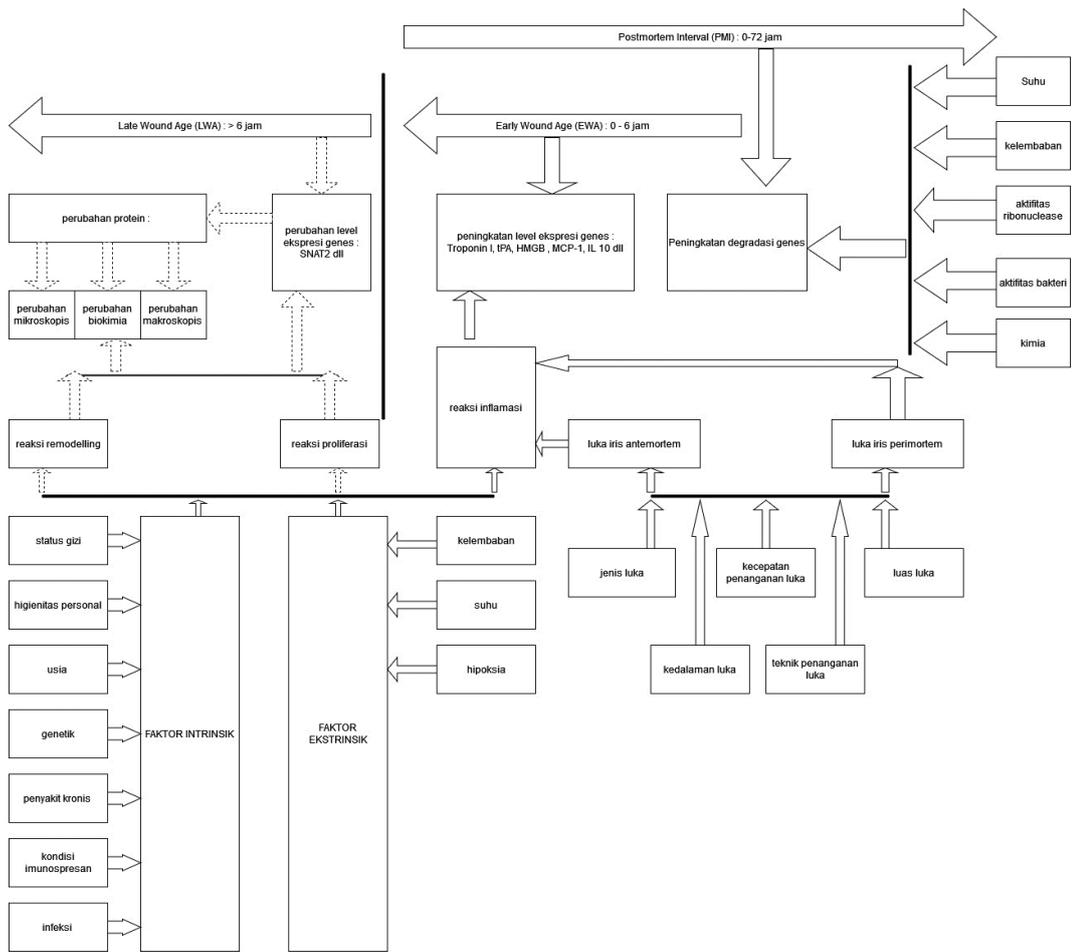
Penelitian tentang tema perbandingan antara ekspresi mRNA pada fase awal penyembuhan luka dengan postmortem interval akan diawali dengan review hasil penelitian sebelumnya untuk memastikan jenis biomarker yang bisa dijadikan penanda umur luka pada fase awal, yaitu : biomarker yang paling stabil yang nilai peningkatan maupun penurunannya gradual menurut waktu. Biomarker tersebut dapat diperiksa pada rentang waktu kematian awal (early postmortem interval/EPI) hingga beberapa hari pada rentang waktu kematian lanjut (late postmortem interval/LPMI). Penelitian pada tikus akan dikalibrasikan hasilnya dengan penelitian pada manusia. Biomarker yang telah terbukti stabil akan dilanjutkan dengan penelitian rapid kit test dengan metode *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP). Selengkapnya dapat saya gambarkan dalam diagram, sebagai berikut :



Gambar 7. Tahapan Metode *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP)

3.2 Kerangka teori

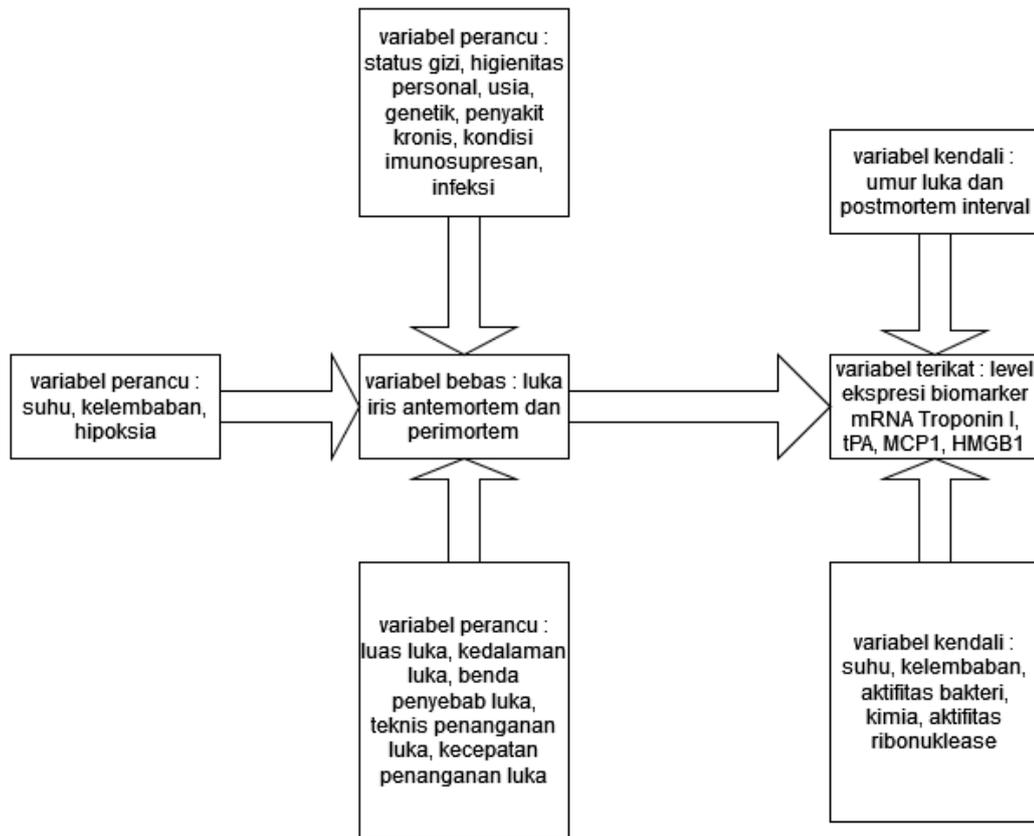
Umur luka dapat diperkirakan dari proses penyembuhan luka karena setiap fase dalam penyembuhan luka berlangsung dalam waktu tertentu dengan melibatkan proses molekuler yang kompleks. Penyembuhan luka dipengaruhi oleh beragam faktor eksternal dan internal korban/pasien. Postmortem interval dapat diperkirakan berdasarkan metode makroskopis, biokimia, entomologi dan molekuler. Postmortem dibagi menjadi 2 periode, yaitu postmortem interval awal dan postmortem interval lanjut. Dalam kerangka teori akan dijabarkan berbagai faktor yang saling berkaitan dengan variabel bebas, variabel perancu, variabel antara maupun variabel tergantung. variabel bebas penelitian adalah luka iris antemortem dan perimortem, Sementara itu, variabel tergantung adalah level ekspresi mRNA troponin I, tPA, MCP 1 dan HMGB 1. Selengkapnya digambarkan dalam diagram berikut ini:



Gambar 8. Kerangka Teori

3.3 Kerangka konsep

Kerangka konsep penelitian menggambarkan hubungan antara variabel bebas, variabel tergantung, variabel antara, variabel kendali dan variabel perancu sebagai berikut :



Gambar 9. Kerangka Konsep

3.4 Hipotesis penelitian

Hipotesis alternative (H_a) penelitian ini adalah terdapat perbedaan jenis luka iris berdasarkan level ekspresi mRNA Troponin i, tPA, MCP-1 dan HMGB-1 mencit balb/c pada periode *postmortem interval* (PMI).

Hipotesis nol (H_0) penelitian ini adalah tidak terdapat perbedaan jenis luka iris berdasarkan level ekspresi mRNA Troponin i, tPA, MCP-1 dan HMGB-1 mencit balb/c pada periode *postmortem interval* (PMI).