

**PENGARUH SUHU TUBUH HEWAN COBA TERHADAP
VOLUME ISKEMIA OTAK DAN ANGKA MORTALITAS TIKUS
(*RATTUS NORVEGICUS*) PASCA *TRANSIENT BILATERAL
COMMON CAROTIS ARTERY OCCLUSION* (BCCAO)**

Karya Tulis Ilmiah

Untuk Memenuhi Sebagian Syarat
Memperoleh Derajat Sarjana Kedokteran

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER



Oleh :

Muh Ikram M Tahir

11711042

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA**

2017

**EFFECT OF BODY TEMPERATURE OF ANIMAL TRIAL ON
CEREBRAL ISCHEMIA VOLUME AND MORTALITY RATE OF
RATS AFTER TRANSIENT OCCLUSION OF BILATERAL
COMMON CAROTID ARTERY**

A SCIENTIFIC PAPER

Submitted in Partial Fulfillment of Requirement
for the Medical Scholar Degree

MEDICAL EDUCATION PROGRAM



By :
Muh Ikram M Tahir
11711042

**FACULTY OF MEDICINE
ISLAMIC UNIVERSITY OF INDONESIA
YOGYAKARTA
2017**

LEMBAR PENGESAHAN

KARYA TULIS ILMIAH

PENGARUH SUHU TUBUH HEWAN COBA TERHADAP VOLUME
ISKEMIA OTAK DAN ANGKA MORTALITAS TIKUS (*RATTUS
NORVEGICUS*) PASCA *TRANSIENT BILATERAL COMMON CAROTIS
ARTERY OCCLUSION (BCCAO)*

Disusun dan diajukan oleh:

Muh Ikram M Tahir

11711042

Telah diseminarkan tanggal 5 Maret 2017 disahkan dan disetujui oleh:

Penguji

Pembimbing Utama

dr. Kuswati M.Sc

dr. Ety Sari Handayani M.Kes

Ketua Prodi Pendidikan Dokter

dr. Hj. Erlina Marfianti, M.Sc., Sp.PD

Disahkan

Dekan Fakultas Kedokteran



dr. Hj. Linda Rosita, M Kes, Sp.PK

iii

**PENGARUH SUHU TUBUH HEWAN COBA TERHADAP
VOLUME ISKEMIA OTAK DAN ANGKA MORTALITAS TIKUS
(*RATTUS NORVEGICUS*) PASCA *TRANSIENT BILATERAL
COMMON CAROTIS ARTERY OCCLUSION (BCCAO)***

Muh Ikram M Tahir¹, Ety Sari Handayani², Kuswati²

¹ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia,

² Staff Departemen Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

INTISARI

Latar Belakang : Studi meta analisis menunjukkan bahwa hipotermia dapat memperbaiki kondisi iskemia otak dan mengurangi angka mortalitas pada hewan model stroke. Suhu lingkungan akan mempengaruhi keberhasilan model stroke pada hewan coba. Penelitian yang menilai pengaruh suhu terhadap angka mortalitas dan volume iskemia otak tikus belum pernah dilakukan di Indonesia. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui apakah ada pengaruh perubahan suhu tubuh hewan coba terhadap volume iskemia otak dan angka mortalitas tikus (*Rattus Norvegicus*) pasca *transient* BCCAO.

Metode Penelitian : Rancangan penelitian ini adalah *post test only control group design*, menggunakan tikus putih berusia 3 bulan, dan berat badan 150-200 gram, menggunakan tikus sebanyak 43 ekor. Induksi iskemia selama 5 dan 10 menit dengan *reperfusion* 24 jam. Kelompok tikus dibagi berdasarkan suhu optimal tikus $>36^{\circ}\text{C}$ dan suhu non optimal $< 36^{\circ}\text{C}$. Volume iskemia otak diukur menggunakan metode Cavalieri pada otak yang diwarnai dengan TTC. Uji pengaruh suhu tubuh terhadap angka mortalitas tikus menggunakan kai kudarat. Uji pengaruh suhu terhadap volume iskemia otak menggunakan one way ANOVA.

Hasil : Tidak terdapat perbedaan bermakna antara suhu dengan angka mortalitas ($p>0,05$) dan rerata volume iskemia antar kelompok ($p>0,05$).

Kesimpulan : Tidak terdapat pengaruh suhu terhadap angka mortalitas dan volume iskemia otak tikus pasca *transient* BCCAO

Kata Kunci : Suhu, BCCAO, Volume Iskemia Otak, Angka Mortalitas.

EFFECT OF BODY TEMPERATURE OF ANIMAL TRIAL ON CEREBRAL ISCHEMIA VOLUME AND MORTALITY RATE OF RATS AFTER TRANSIENT OCCLUSION OF BILATERAL COMMON CAROTID ARTERY

Muh Ikram M Tahir¹, Ety Sari Handayani², Kuswati²

¹Student of Faculty of Medicine, Islamic University of Indonesia

²Department of Anatomy Faculty of Medicine, Islamic University of Indonesia

ABSTRACT

Background : Some journals and meta-analyzes have shown an improvement of stroke with cold therapy or therapeutic hypothermia, and has conducted research on mortality in mice with changes in temperature, but there has been no research done in Indonesia. To determine whether there is influence changes in body temperature of experimental animals to the volume of cerebral ischemia and mortality rat (*Rattus Norvegicus*) post transient BCCAO.

Methods : The research was post test only control group design, using 43 white mouse aged 3 months, and weigh 150-200 grams. Induction of ischemia for 5 and 10 minutes with a 24-hour reperfusion. Group of rats was divided by the optimal temperature rat $> 36^{\circ}\text{C}$ and non-optimal temperatures $< 36^{\circ}\text{C}$. The volume of cerebral ischemia measured using the Cavalieri method on brain stained with TTC. Test of the effect of temperature on mortality in mice using kai Kuadrat. Test of the effect of temperature on the volume of cerebral ischemia using one-way ANOVA.

Results : There was no significant difference between the temperature with mortality ($p > 0.05$) and the mean volume of ischemia between groups ($p > 0.05$).

Conclusion : There is no effect of temperature on mortality rate and cerebral ischemia volume after transient BCCAO.

Keywords : Temperature, BCCAO, Ischemia Volume, Mortality Rate.

PENDAHULUAN

Stroke adalah penyakit multifaktorial yang disebabkan oleh berbagai penyebab dan disertai manifestasi mayor, menjadi penyebab utama kecacatan dan kematian di negara-negara berkembang¹. Stroke didefinisikan oleh WHO sebagai suatu tanda klinis yang berkembang dengan cepat diakibatkan oleh gangguan otak fokal (atau global) dengan gejala yang berlangsung selama 24 jam atau lebih, dan dapat menyebabkan kematian tanpa adanya penyebab lain yang jelas selain vaskuler².

Beberapa tahun terakhir penggunaan model hewan meningkatkan pemahaman terhadap mekanisme patofisiologi stroke. Tikus adalah hewan model stroke yang paling umum dilakukan.

Rat stroke model terdiri dari global iskemia dan *focal* iskemia. Iskemia *focal* ditandai dengan pengurangan aliran darah otak di daerah yang berbeda dari otak, sedangkan di iskemia global pengurangan aliran darah mempengaruhi seluruh otak atau otak depan. Salah satu contoh global iskemik adalah oklusi arteri carotis communis bilateral³. menyatakan bahwa teknik BCCAO dapat digunakan untuk mempelajari

mekanisme obat neuroprotektan. Model ini dapat mengidentifikasi mekanisme yang menyebabkan kerusakan jaringan serta menjadi dasar pengembangan terapi stroke pada tingkat pre klinis⁴.

Teknik BCCAO dilakukan dengan mengikat arteri karotis komunis bilateral tikus selama beberapa menit, kemudian dilanjutkan dengan pelepasan ikatan tersebut (*reperfusion*). Periode ikatan dan periode *reperfusion* menyebabkan kerusakan pada sel otak. Studi literatur menunjukkan bahwa ada beberapa variasi oklusi BCCAO dan durasi reperfusi pasca BCCAO yang dapat menyebabkan iskemia otak. Variasi oklusi arteri communis bilateral adalah 15 – 60 menit, sedangkan durasi periode reperfusi pasca BCCAO bervariasi antara 1 jam, 24 jam dan 48 hari. Perbedaan durasi BCCAO akan menyebabkan perbedaan area iskemia pada otak⁵

Beberapa tahun terakhir penggunaan model hewan meningkatkan pemahaman terhadap mekanisme patofisiologi stroke. Tikus adalah hewan model stroke yang paling umum dilakukan⁴.

Rat stroke model terdiri dari global iskemia dan *focal* iskemia. Iskemia

focal ditandai dengan pengurangan aliran darah otak di daerah yang berbeda dari otak, sedangkan di iskemia global pengurangan aliran darah mempengaruhi seluruh otak atau otak depan. Salah satu contoh global iskemik adalah oklusi arteri carotis communis bilateral. Teknik BCCAO dapat digunakan untuk mempelajari mekanisme obat neuroprotektan³. Model ini dapat mengidentifikasi mekanisme yang menyebabkan kerusakan jaringan serta menjadi dasar pengembangan terapi stroke pada tingkat pre klinis⁴.

Teknik BCCAO dilakukan dengan mengikat arteri karotis komunis bilateral tikus selama beberapa menit, kemudian dilanjutkan dengan pelepasan ikatan tersebut (*reperfusion*). Periode ikatan dan periode *reperfusion* menyebabkan kerusakan pada sel otak. Studi literatur menunjukkan bahwa ada beberapa variasi oklusi BCCAO dan durasi reperfusi pasca BCCAO yang dapat menyebabkan iskemia otak. Variasi oklusi arteri komunis bilateral adalah 15 – 60 menit, sedangkan durasi periode reperfusi pasca BCCAO bervariasi antara 1 jam, 24 jam dan 48 hari. Perbedaan durasi BCCAO akan menyebabkan perbedaan area iskemia

pada otak⁵

Penelitian *Impact Of Seasonal Temperatures and Laboratory Room on Mortality of Rats with Ischemic Brain Injury*. Penelitian ini menggunakan data retrospektif untuk mengeksplorasi hubungan antara musim letak geografis (musim panas dan dingin) dengan kemudian menyelidiki pengaruh suhu terkondisi laboratorium.

Pada penelitian meta-analisis yang lain oleh Olai *et al.* (20016). *Protocol For Meta-Analysis of Temperature Reduction in Animal Model of Cardiac Arrest*. Melakukan manajemen suhu tertarget (TTM) dari 32-34°C. Melihat adanya intervensi suhu mengurangi iskemia global dalam hewan coba.¹¹

Penelitian meta-analisis oleh Bart *et al.* (2007), *Hypothermia in Animal Models of Acute Ischemic Stroke: A Systemic Review and Meta-Analysis*. Dilakukan dengan menginduksi tikus dengan hipotermia sebagai pengobatan terhadap stroke akut, sudah ada beberapa penelitian tentang manfaat terapi pendinginan pada stroke. Tikus dibuat hipotermia dengan suhu rendah < 31°C. Selain itu juga diamati dalam suhu 35°C dengan memulai pengobatan antara 90 sampai 180 menit.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *post test only control group design*. Penelitian ini berjalan 2 tahap yaitu tahap pertama untuk menguji pengaruh suhu tubuh terhadap angka mortalitas tikus pasca BCCAO. Tahap kedua adalah untuk menguji pengaruh suhu tubuh terhadap volume iskemia otak tikus pasca BCCAO.

Subjek penelitian adalah tikus putih (*rattus norvegicus*) galur wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi adalah tikus putih *rattus norvegicus*, dengan usia 3 bulan, berat badan 150-200 gram. Kriteria eksklusi adalah tikus yang tidak sehat atau cacat. Pada penelitian ini digunakan hewan coba dengan rincian seperti berikut:

1. Tahap I penelitian. Pada tahap 1 digunakan tikus yang terbagi menjadi 2 kelompok untuk induksi iskemia 5 menit dengan *reperfusion* 24 jam, dan kelompok induksi iskemia 10 menit dengan *reperfusion* 24 jam.
2. Tahap II penelitian. Pada tahap kedua digunakan tikus yang terbagi menjadi kelompok 1

perlakuan suhu optimal dengan durasi 5 menit, kelompok 2 perlakuan suhu non optimal dengan durasi 5 menit, kelompok 3 perlakuan suhu optimal dengan durasi 10 menit dan kelompok 4 perlakuan suhu non-optimal dengan durasi 10 menit.

Dilakukan uji normalitas dan homogen, jika normal maka rerata hewan yang mati pada masing masing kelompok akan diuji menggunakan uji kai kuadrat dan rerata volume iskemia otak pada masing masing kelompok diuji dengan uji ANOVO *one way* dan dilanjutkan *post hoc*.

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan no.protokol 19/Ka.Kom.Et/70/KE/II/2017. Subjek penelitian yang digunakan adalah 43 ekor tikus putih (*rattus norvegicus*) galur wistar yang mendapatkan perlakuan BCCAO 5 dan 10 menit dengan reperfusi 24 jam.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

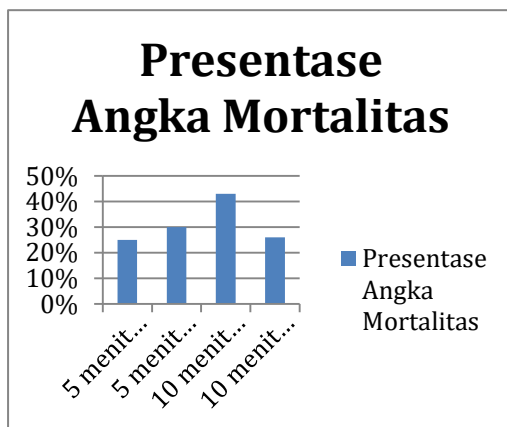
Hasil Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite

Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan no.protokol 19/Ka.Kom.Et/70/KE/II/2017. Subjek penelitian yang digunakan adalah 43 ekor tikus putih (*rattus norvegicus*) galur wistar yang mendapatkan perlakuan BCCAO 5 dan 10 menit dengan reperfusi 24 jam.

Angka mortalitas tikus pasca ligase arteri carotis communis bilateral selama 5 dan 10 menit yang diikuti dengan periode *reperfusion* 24 jam tampak pada gambar gambar 1.

Gambar 1 . Angka mortalitas tikus



Gambar 1. Angka mortalitas tikus berdasarkan suhu

Uji kai kuadrat dilakukan pada masing-masing waktu induksi iskemia yaitu 5 menit dan 10 menit. Berdasarkan hasil *Fisher's Exact Test* maka didapatkan hasil bahwa tidak terdapat pengaruh bermakna suhu terhadap angka mortalitas tikus pasca ligase arteria carotis communis

bilateral selama 5 dan 10 menit dengan *reperfusion* 24 jam (tabel I)

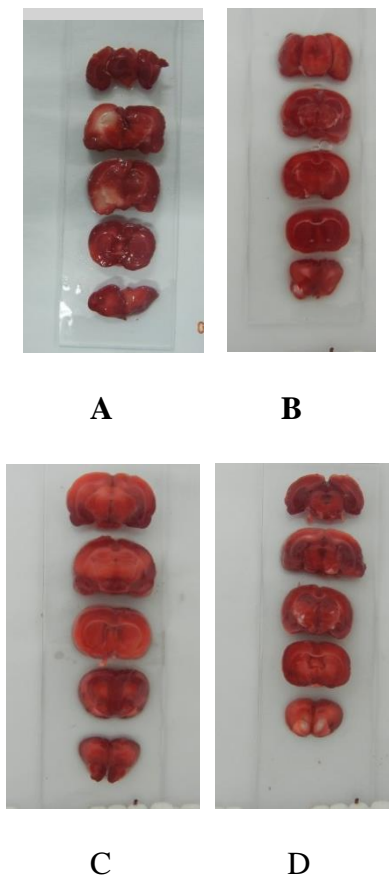
Tabel I

Kelompok	P
Durasi 5 menit	1,000
Durasi 10 menit	0,630

Hasil pengamatan suhu terhadap volume iskemia diuji dengan menggunakan *One Way Anova*. Sebelum dilakukan uji *One Way Anova*, terlebih dulu dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk*. Hasil uji *One Way Anova* didapatkan *P value* 0.474..Tidak terdapat perbedaan bermakna antara rerata volume iskemia kelompok 1,2,3 dan 4 (Tabel II).

Tabel II. Analisis Data Pengaruh Suhu Terhadap Volume Iskemia .

Kelompok	Rerata Volume (mm ³)	SD	P
1	112	21.16	0.474
2	128	19.59	
3	236	218.06	
4	197	181.26	



Gambar 2. Iskemia Otak Tikus

Pembahasan

Penelitian ini menguji apakah suhu hewan coba berpengaruh terhadap angka kematian tikus pasca BCCAO dengan durasi iskemia 5 dan 10 menit. Batas suhu hewan coba yang diteliti adalah 36°C. Angka mortalitas pasca ligase arteria carotis communis bilateral selama 5 menit lebih tinggi pada kelompok suhu < 36°C (30%) dibandingkan dengan suhu optimal >

36°C (25%). Sebaliknya pada kelompok durasi iskemia 10 menit, angka mortalitas kelompok suhu optimal (43%) lebih tinggi daripada kelompok suhu non optimal (26%). Walaupun perbedaan angka mortalitas antara kelompok tidak menunjukkan perbedaan bermakna secara statistika ($p > 0,05$).

Penelitian menggunakan teknik BCCAO memiliki prosedur untuk mempertahankan suhu tubuh hewan coba selama tindakan induksi dan periode *reperfusion*. Beberapa penelitian membuktikan bahwa suhu tubuh hewan coba berpengaruh terhadap angka mortalitas tikus. Selain suhu hewan coba maka suhu ruangan laboratorium dan iklim negara tempat penelitian tersebut berlangsung akan mempengaruhi angka mortalitas tikus (Gopalakrishnan *et al.*, 2016). Tindakan BCCAO yang dilakukan pada saat musim panas akan meningkatkan angka mortalitas tikus. Indonesia merupakan negara dengan dua musim serta terletak di daerah katulistiwa. Iklimnya yang cenderung panas dapat mempengaruhi angka mortalitas tikus pasca BCCAO. Sayangnya, masih sedikit data tentang angka mortalitas tikus pasca BCCAO.

Kemungkinan lainnya mengapa angka mortalitas pada

penelitian ini lebih rendah dari rerata adalah penggunaan ketamine sebagai anastesi. Kombinasi ketamine–Xylazine (KT-XY) dapat mempengaruhi hemodinamik tubuh dan mekanisme pengaturan suhu tubuh sehingga suhu tubuh hewan coba dapat menurun sampai $32,30 \pm 0,090^\circ \text{C}$. Efek ini dapat berlangsung sampai 150 menit pasca anastesi. Penurunan suhu tubuh akibat penggunaan KT-XY merupakan salah satu penyebab tersering kematian hewan coba pasca BCCAO¹¹ Hasil penelitian ini tidak menunjukkan perbedaan bermakna angka mortalitas antara masing-masing kelompok. Hal ini dapat disebabkan karena kurangnya jumlah sampel penelitian. Salah satu penelitian meta analisis menganjurkan minimal jumlah sampel untuk menghitung angka mortalitas pasca MCAO adalah 60 ekor tikus¹², sedangkan penelitian ini hanya menggunakan 43 tikus.

Penelitian tahap kedua menilai apakah terdapat pengaruh suhu tubuh hewan coba terhadap volume iskemia tikus pasca BCCAO selama 5 dan 10 menit. Hasil uji terhadap rerata volume iskemia menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok suhu $< 36^\circ \text{C}$ dengan kelompok suhu $> 36^\circ \text{C}$ ($p > 0,05$).

Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menginduksi iskemia pada suhu 33°C . Hipotermia ringan dapat mengurangi cedera iskemia serebral baik global dan fokal. Penelitian ini membandingkan suhu hipotermia (33°C) dengan suhu normal dimulai 1 jam setelah oklusi arteri permanen (pMCAO). Penelitian ini dilakukan dalam 3 waktu yaitu 12, 24, dan 48 jam¹³.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Tidak ada pengaruh suhu hewan coba terhadap angka mortalitas dan volume iskemia tikus pasca BCCAO.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh suhu terhadap angka mortalitas dengan suhu $33-34^\circ \text{C}$, $34-35^\circ \text{C}$, $35-36^\circ \text{C}$, dan $36-37^\circ \text{C}$.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan jumlah tikus yang lebih banyak.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan model hipotermia sebelum induksi, selama induksi dan setelah induksi iskemia

4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan anastesi non ketamine seperti chloral hidrat untuk menilai hubungan suhu hewan coba dengan angka mortalitas dan volume iskemia otak tikus pasca BCCAO

DAFTAR PUSTAKA

1. Saidi, S., Mahjoub T., Almawi, W.Y., 2010. Aldosterone Synthase Gene (CYP11B2) Promoter Polymorphism as a Risk Factor for Ischemic Stroke in Tunisian Arabs. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 11: 180.
2. World Health Organization, 2010-a. Deaths from Stroke. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/cvd_atlas_16_death_from_stroke.pdf [diakses tanggal 20 February 2016]
3. Nandagopal, M. et al., 2010. Behavioral assessment studies in Cerebral ischemia induced by. , 1(1), pp.208–223.
4. Bacigaluppi, M., Comi, G., Hermann, D.M., 2010. Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia. *The Open Neurology Journal*, 4, pp. 34-38.
5. Singh, R.K. et al., 2007. Effect of ethanolic extract of root of *Pongamia pinnata* (L) pierre on oxidative stress, behavioral and histopathological alterations induced by cerebral ischemia – reperfusion and long-term hypoperfusion in rats. , 45(October), pp.868–876.
6. Lapi, D., Vagnani, S., Pignataro, G., Esposito, E., Paterni, M., Colantouni, A. 2012. Protective effects of quercetin on rat pial microvascular changes during transient bilateral common carotid artery occlusion and reperfusion. *Frontiers in Physiology*, 3 MAR(March), pp.1–12.
7. Deb, B., Sreenath, C., Kumar, N., Elango, K., 2012. Neuroprotective effect of spiradoline and naloxone in focal cerebral ischemia: Promising behavioral and biochemical changes in Wistar rats, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02(03), pp.106–111.
8. Cai, M., 2016. Apigenin-7-O-β-D-(-6'-p-coumaroyl)-Glucopyranoside Treatment Elicits Neuroprotective Effect against Experimental Ischemic Stroke. *International Journal of Biological Sciences*, 12(1), pp.42–52.
9. Aktürk, Z., Odaci, E., İkinci, A., Bas, O., Canpolat, S., Colakgu, S., Sonmez, O., 2014. Effect of Ginkgo biloba on brain volume after carotid artery occlusion in rats: a stereological and histopathological study. 44:546–553.
10. Kumar, K., Sastry, V.G., 2012. Protective Effect of *Trewia Nudiflora* Against. , 2(1), pp.7–12.
11. Gopalakrishanan, S. et al., 2016. Impact of Seasonal Variant Temperatures and Laboratory Room Ambient Temperature on Mortality of Rats with Ischemic Brain Injury. , pp.1–6.
12. Sena, E.S. et al., 2013. The benefit of hypothermia in experimental ischemic stroke is not affected by pethidine. *International Journal of Stroke*, 8(3), pp.180–185.
13. Clark, D.L. et al., 2008. Comparison of 12, 24 and 48 h of systemic hypothermia on outcome after permanent focal ischemia in rat. *Experimental Neurology*, 212, pp.386–392.

