

**PERBEDAAN KADAR LAKTAT DEHIDROGENASE PADA
KORTEKS CEREBRI TIKUS (*Rattus norvegicus*) DENGAN
VARIASI DURASI LIGASI TRANSIEN ARTERI CAROTIS
COMMUNIS BILATERAL**

Karya Tulis Ilmiah

Untuk Memenuhi Sebagian Syarat
Memperoleh Derajat Sarjana Kedokteran

Program Studi Sarjana Kedokteran



oleh:

Sifa Anisa Yaoma

14711006

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
2017/2018**

**THE DIFFERENCES OF LACTATE DEHYDROGENASE
CONCENTRATION IN RAT CEREBRAL CORTEX (*Rattus
norvegicus*) WITH VARIED DURATION OF TRANSIENT
LIGATION OF BILATERAL COMMON CAROTID ARTERY**

A Scientific Paper

Submitted as Fulfillment

To Obtain the Medical Degree

MEDICAL EDUCATION PROGRAM



by:

Sifa Anisa Yaoma

14711006

**MEDICAL FACULTY
ISLAMIC UNIVERSITY OF INDONESIA**

YOGYAKARTA

2017/2018

KARYA TULIS ILMIAH

**PERBEDAAN KADAR LAKTAT DEHIDROGENASE PADA KORTEKS
CEREBRI TIKUS (*Rattus norvegicus*) DENGAN VARIASI DURASI
LIGASI TRANSIEN ARTERI CAROTIS COMMUNIS BILATERAL**

Disusun dan diajukan oleh :


Sifa Anisa Yaoma

14711006

Telah diseminarkan tanggal : 18 Januari 2018

dan telah disetujui oleh :

Penguji,


dr. Miranti Dewi Pramaningtyas, M.Sc

Pembimbing Utama,


dr. Titis Nurmasitoh, M.Sc

Ketua Prodi Pendidikan Dokter


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

Disahkan:

Dekan


dr. Linda Rosita Sp.PK, M.Kes



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PERSETUJUAN.....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
HALAMAN PERNYATAAN	viii
KATA PENGANTAR	ix
INTISARI.....	xi
ABSTRACT.....	xii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
1.5. Keaslian Penelitian.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Tinjauan Pustaka	6
2.1.1. Stroke	6
2.1.2. Korteks Cerebri	8
2.1.3. Enzim Laktat Dehidrogenase	9
2.2. Kerangka Teori.....	13
2.3. Kerangka Konsep	14
2.4. Hipotesis.....	14
BAB III. METODE PENELITIAN.....	15
3.1. Rancangan Penelitian	15
3.2. Waktu dan Tempat Penelitian	15
3.3. Subjek Penelitian.....	15
3.4. Variabel Penelitian	16
3.4.1. Variabel Terikat	16
3.4.2. Variabel Bebas	16

3.5. Definisi Operasional.....	17
3.6. Alat dan Bahan Penelitian.....	17
3.6.1. Alat Penelitian.....	17
3.6.2. Bahan Penelitian.....	18
3.7. Tahap Penelitian.....	18
3.7.1. Persiapan Hewan Coba	18
3.7.2. Ligasi Arteri Carotis Communis	18
3.7.3. Perlakuan <i>Sham Operated</i>	19
3.7.4. Eutanasia	20
3.7.5. Pengambilan Spesimen	20
3.7.6. Pengukuran Kadar LDH Korteks	20
3.8. Analisis Data	22
3.9. Etika Penelitian	22
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1. Hasil	23
4.1.1. Karakteristik Subjek.....	23
4.1.2. Hasil Pemeriksaan Kadar LDH.....	24
4.2. Pembahasan.....	25
BAB V. SIMPULAN DAN SARAN	29
5.1. Simpulan	29
5.2. Saran.....	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN.....	33

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Rata-rata \pm SEM Kadar LDH Korteks	25
--	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Proses iskemia	7
Gambar 2. Perubahan piruvat menjadi laktat di dalam astrosit dan konsumsi laktat oleh neuron	10
Gambar 3. Perubahan glikogen menjadi laktat	11
Gambar 4. Metabolisme laktat dalam sel neuron	12
Gambar 5. Kerangka teori	12
Gambar 6. Kerangka konsep	13

HALAMAN PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Karya Tulis Ilmiah dengan judul “Perbedaan Kadar Laktat Dehidrogenase pada Korteks Cerebri Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan Variasi Durasi Ligasi Transien Arteri Carotis Communis Bilateral” ini tidak terdapat Karya Tulis Ilmiah yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat Karya Tulis Ilmiah atau penelitian yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dijadikan referensi dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 16 Januari 2018



Sifa Anisa Yaoma

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum wr. wb.

Alhamdulillahirabbil'alamin. Pertama- tama, puji syukur penyusun sampaikan kehadiran Allah SWT karena dengan rahmat, hidayah, serta karunia-Nya Karya Tulis Ilmiah (KTI) yang berjudul “Perbedaan Kadar Laktat Dehidrogenase pada Korteks Cerebri Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan Variasi Durasi Ligasi Transien Arteri Carotis Communis Bilateral” dapat diselesaikan. Kedua, shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang telah menuntun umat-umatnya dari jaman belum berkembang ilmu pengetahuan dan teknologi hingga jaman yang penuh perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi seperti saat ini.

Karya Tulis Ilmiah ini dibuat untuk memenuhi salah satu syarat kelulusan dalam memperoleh gelar Sarjana Strata 1 (S1) pada Program Studi Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini mulai penyusunan proposal hingga hasil penelitian, karya ini mendapat bimbingan, arahan, bantuan, dan dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu, penyusun ingin memberikan penghargaan dan ucapan terimakasih yang ditujukan kepada:

1. dr. Linda Rosita, M.Kes., Sp.PK., selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dr. Erlina Marfianti, M.Sc., Sp.PD., selaku ketua Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.
2. dr. Titis Nurmasitoh, M.Sc, selaku pembimbing karya tulis ilmiah saya yang berjudul “Perbedaan Kadar Laktat Dehidrogenase pada Korteks Cerebri Tikus (*Rattus norvegicus*) dengan Ligasi Transien Arteri Carotis Communis Bilateral” yang telah dengan sabar dan ikhlas memberikan bimbingan, arahan, motivasi, dan kemudahan dalam penyusunan karya tulis ini.
3. dr. Miranti Dewi Pramaningtyas, M.Sc, selaku penguji karya tulis ilmiah saya yang memberikan penilaian, arahan, saran, dan kritik guna menyempurnakan karya tulis ilmiah ini.
4. Kedua orang tua saya tercinta Abdullah Maskur, S.E., M.Si. dan Sulistyو Wijayanti, S.E. yang telah memberikan dukungan moril dan materil yang tidak terhingga untuk mewujudkan cita-cita saya menjadi dokter. Terima kasih mama dan papa telah memberikan doa, kasih sayang, nasihat dan motivasi semangat yang tiada henti serta seluruh dukungan baik secara moral maupun finansial.
5. Adik saya tercinta, Syafiya Hasna Yaoma yang telah memberikan semangat kepada kakaknya untuk segera menyelesaikan karya tulis ilmiah. Semoga karya tulis ilmiah ini kelak dapat menjadi penyemangat adik untuk terus memperoleh ilmu.
6. Keluarga besar saya yang telah memberikan doa dan motivasi selama ini.

7. Sahabat-sahabat saya yang saya kenal sejak menempuh pendidikan kedokteran, Fishella Aprista Rahmanti, Naomi Pradita Yuwana, dan Belinda Citra Permatasari. Terima kasih sudah menjadi keluarga dan teman perjuangan di tanah perantauan. *See you on top!*
8. Sahabat- sahabat terbaik, Jasmine Nadhira L, Laksmi Zhafira Disa, Sabrina Aulia, Erina Kartika, Santya Nareswari. Terima kasih sudah menjadi tempat bercerita dikala suka dan duka, pemberi semangat dan doa.
9. Teman teman saya pengurus harian SMART tahun 2016-2017, terima kasih sudah menjadi teman berorganisasi sekaligus teman bermain.
10. Teman-temanku seperjuangan penelitian, Verlita Utami, Luthfianisa Azhari, Adelina Pramestuti, Aditia, dan Yusa M.T., yang telah bekerja sama dalam menyelesaikan penelitian ini.
11. Teman-teman sejawatku, BISTAZAM FK UII 2014 terutama teman teman tutorial 5 pada tahun pertama, tutorial 4 pada tahun kedua, tutorial 1 pada tahun ketiga, dan tutorial 15 pada tahun keempat. Terima kasih sudah menjadi teman-teman yang baik sejak 2014. Semoga Allah memudahkan jalan kita semua untuk menjadi dokter muslim *rahmatan lil'alamin. Amiiin.*
12. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penyusun meminta maaf jika dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini terdapat kesalahan. Penyusun menyadari bahwa karya tulis ilmiah ini masih memiliki banyak kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun diperlukan guna memperbaiki karya tulis ilmiah ini. Semoga karya tulis ilmiah ini dapat bermanfaat bagi berbagai pihak yang membacanya dan dapat menjadi ilmu untuk menambah bahan wawasan untuk kita semua.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Yogyakarta, 16 Januari 2018

Sifa Anisa Yaoma

INTISARI

Latar Belakang: Stroke masih menjadi urutan kedua penyebab kematian terbesar di dunia setelah penyakit jantung, yaitu 11,13% dari total kematian. Salah satu model penelitian dalam stroke adalah BCCAO (*bilateral common carotid artery occlusion*). Namun masih terdapat variasi perbedaan durasi ligasi BCCAO terhadap respons iskemik otak yang menunjukkan belum adanya standarisasi mengenai teknik BCCAO. Laktat Dehidrogenase (LDH) merupakan biomarker adanya kerusakan sel seperti pada iskemik. Sehingga penelitian ini akan melihat perbedaan kadar laktat dehidrogenase pada korteks cerebri tikus (*Rattus norvegicus*) dengan ligasi transien arteri carotis communis bilateral.

Tujuan: Mengetahui perbedaan kadar laktat dehidrogenase pada korteks cerebri tikus (*Rattus norvegicus*) dengan variasi durasi ligasi transien arteri carotis communis bilateral.

Metode Penelitian: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental kuasi dengan rancangan post-test control group. Subjek penelitian ialah 24 tikus (*Rattus norvegicus*) Wistar dewasa yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Subjek dibagi menjadi empat kelompok yaitu kelompok I merupakan *sham operated* yaitu kelompok yang mengalami insisi tanpa diligasi, kelompok II dengan durasi ligasi 5 menit, kelompok III dengan durasi ligasi 10 menit, dan kelompok IV dengan durasi ligasi 15 menit. Perbedaan kadar LDH dianalisa menggunakan one-way ANOVA.

Hasil: Kadar LDH korteks cerebri tikus kelompok I yaitu 1.31 ng/ml. Kadar LDH kelompok II yaitu 1.15 ng/ml. Kadar LDH kelompok III paling tinggi yaitu 1.48 ng/ml. Kelompok IV memiliki kadar LDH sebesar 1.26 ng/ml.

Kesimpulan: Tidak terdapat perbedaan kadar laktat dehidrogenase pada korteks cerebri tikus (*Rattus norvegicus*) dengan variasi durasi ligasi transien arteri carotis communis bilateral.

Kata kunci: BCCAO, Laktat dehidrogenase, Korteks cerebri *Rattus norvegicus*

ABSTRACT

Background: Stroke remains the second largest cause of death in the world after heart disease, ie 11.13% of total deaths. One of the research models in stroke is BCCAO (bilateral common carotid artery occlusion). However, those are variations of BCCAO ligation duration in ischemic brain which shows no standardization of BCCAO technique. Lactate Dehydrogenase (LDH) is a biomarker of cell damage such as ischemic. This study will look at the differences of lactate dehydrogenase concentration in rat cerebral cortex (*Rattus norvegicus*) with varied duration of transient ligation of bilateral common carotid artery.

Objective: To determine the differences of lactate dehydrogenase concentration in rat cerebral cortex (*Rattus norvegicus*) with varied duration of transient ligation of bilateral common carotid artery.

Research Method: This research is a quasi-experimental research with post-test control group design. The subjects were 24 rats (*Rattus norvegicus*) which fulfill inclusion and exclusion criteria. Subjects were divided into four groups: group I is a sham group with incision without ligation, group II with 5 minutes ligation, group III with 10 minutes ligation, and group IV with 15 minutes ligation. Differences of LDH levels are analyzed using one-way ANOVA.

Results: The level of LDH in group I, II, III, and VI consecutively are 1.31 ng/ml, 1.15 ng/ml, 1.48 ng/ml, and 1.26 ng/ml. The group III shows the highest levels of LDH.

Conclusions: There is no difference of lactate dehydrogenase concentration in rat cerebral cortex (*Rattus norvegicus*) with varied duration of transient ligation of bilateral common carotid artery.

Keywords: BCCAO, Lactate dehydrogenase, *Rattus norvegicus* cerebral cortex

BAB I

PENDAHULUAN

3.10. Latar Belakang

Stroke masih menjadi urutan kedua penyebab kematian terbesar di dunia setelah penyakit jantung, yaitu 11,13% dari total kematian. Sekitar 33.000.000 orang di dunia mengalami serangan stroke dan 16.900.000 orang diantaranya mengalami serangan stroke pertama. Setiap tahun, 795.000 orang diperkirakan terkena stroke (AHA, 2015).

Di Amerika Serikat, kematian yang diakibatkan stroke mencapai urutan kelima. Stroke membunuh 130.000 orang pertahun atau 1 dari 19 kematian di Amerika Serikat. Setiap 4 menit, terdapat seorang penduduk Amerika Serikat yang meninggal akibat stroke. Selain itu, setiap 40 menit terdapat kasus stroke baru di Amerika Serikat (CDC, 2009).

Prevalensi stroke di Indonesia pada tahun 2013 sebanyak 2.137.941 orang berdasarkan diagnosis gejala. Sedangkan berdasar diagnosis oleh tenaga kesehatan, jumlah penderita penyakit stroke lebih rendah yaitu 1.236.825 orang. Stroke banyak diderita pada kelompok umur 45-54 tahun, 55-64 tahun, dan 65-74 tahun. Akan tetapi, akhir-akhir ini stroke juga dapat dialami kelompok usia 15-24. Laki-laki lebih banyak mengalami stroke dibanding wanita (Depkes, 2013).

Di Indonesia, stroke merupakan penyebab utama kematian, yaitu mencapai 15,4% pada semua umur. Angka kematian tertinggi terdapat pada kelompok usia 55-64 tahun yaitu mencapai 26,8% pada daerah perkotaan dan 17,4% pada daerah pedesaan. Angka kematian akibat stroke pada kelompok usia 45-54 tahun mencapai 15,9% penduduk perkotaan dan 11,5% pada penduduk pedesaan (Depkes, 2013).

Stroke tidak hanya menyebabkan kematian, akan tetapi juga kerugian yang lain. Dilaporkan oleh *American Heart Association*(AHA) bahwa stroke menyebabkan disabilitas yang seharusnya dapat dicegah (AHA, 2015). Pada penduduk diatas 45 tahun, stroke menyebabkan kecacatan kronik tertinggi di

Indonesia. Dari 500.000 penderita stroke setiap tahun, 2,5% diantaranya atau sebesar 250.000 orang mengalami kematian sedangkan sisanya mengalami kecacatan ringan atau berat. Kecacatan akibat stroke memberi dampak beban ekonomi, beban moral, dan beban emosional yang mengganggu aktivitas dan produktivitas anggota keluarga (Riyadina & Rahajeng, 2013). Stroke juga menjadi penyebab tersering kedua kepikunan setelah Alzheimer (Rambe, 2006). Selain itu, stroke juga menyebabkan seseorang harus dirawat di rumah sakit dalam jangka waktu lama dan menghabiskan biaya yang cukup mahal (Rambe, 2006). Banyaknya dampak yang disebabkan oleh stroke mendorong dilakukannya penelitian mengenai stroke. Pemahaman mengenai stroke secara lebih baik melalui penelitian diharapkan dapat mendorong ditemukannya tatalaksana yang baik.

Salah satu model penelitian yang dapat digunakan dalam stroke adalah *rat stroke model*. Tikus dipilih sebagai hewan coba untuk model stroke karena tikus memiliki fisiologi dan vaskularisasi otak yang mirip dengan manusia (Fluri *et al.*, 2015). Pada *rat stroke model* terdapat dua cara ligasi, yaitu BCCAO (*bilateral common carotid artery occlusion*) dan MCAO (*middle cerebral artery occlusion*). *Bilateral common carotid artery occlusion* merupakan cara ligasi yang mudah dilakukan dan telah memperlihatkan proses iskemik (Speetzen *et al.*, 2013). Meskipun demikian penelitian *rat stroke model* dengan BCCAO belum banyak digunakan dibandingkan dengan ligasi MCAO, oleh karena itu pada penelitian ini digunakan ligasi BCCAO. Berdasarkan literatur yang ada, terdapat variasi durasi ligasi pada teknik BCCAO yang dapat menyebabkan iskemik otak yakni bervariasi mulai 10 menit hingga 30 menit (Raghavendra *et al.*, 2007; Quartu *et al.*, 2017). Dalam penelitian Shcherbak *et al.* (2013) durasi ligasi BCCAO yang digunakan adalah 7 menit. Adanya variasi perbedaan durasi ligasi BCCAO terhadap respons iskemik otak menunjukkan belum adanya standarisasi mengenai teknik BCCAO.

Ketika vaskularisasi ke otak tikus dihambat maka akan terjadi penurunan kadar oksigen ke otak. Keadaan otak yang kekurangan oksigen

disebut hipoksia. Saat otak mengalami hipoksia akan terjadi peningkatan aktivitas enzim laktat dehidrogenase (LDH) (Arandita *et al.*, 2013). Laktat Dehidrogenase dipercaya dapat menjadi biomarker adanya kerusakan sel seperti pada iskemik. Korteks cerebri merupakan salah satu bagian otak yang rentan terhadap keadaan iskemik dibanding area otak lain (Shcherbak *et al.*, 2013). Konsentrasi LDH dapat ditemukan pada serum, cairan cerebrospinal, dan jaringan otak. Hal inilah semakin mendorong peneliti untuk mencari durasi ligasi yang tepat pada BCCAO yang dapat menunjukkan proses iskemik otak dengan mengukur kadar LDH korteks cerebri. Pada penelitian ini, peneliti akan melihat pengaruh durasi ligasi transien arteri carotis communis bilateral terhadap kadar laktat dehidrogenase pada korteks cerebri tikus (*Rattus norvegicus*).

3.11. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah disusun maka rumusan masalah penelitian ini adalah:

Apakah terdapat perbedaan kadar laktat dehidrogenase pada korteks cerebri tikus (*Rattus norvegicus*) dengan variasi durasi ligasi transien arteri carotis communis bilateral?

3.12. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan kadar laktat dehidrogenase pada korteks cerebri tikus (*Rattus norvegicus*) dengan variasi durasi ligasi transien arteri carotis communis bilateral.

3.13. Manfaat Penelitian

Dengan dilakukan penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat yaitu:

1) Bagi Peneliti

Setelah dilakukan penelitian ini, peneliti mengetahui pengaruh durasi ligasi transien arteri carotis communis terhadap kadar laktat dehidrogenase pada korteks cerebri tikus (*Rattus norvegicus*). Selain itu, penelitian ini

sebagai syarat untuk menyelesaikan sarjana kedokteran di Universitas Islam Indonesia.

2) Bagi Masyarakat

Manfaat penelitian ini bagi masyarakat adalah memperbanyak ilmu pengetahuan mengenai model penelitian stroke menggunakan hewan coba yaitu tikus.

3.14. Keaslian Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan adalah penelitian baru dan belum pernah dilakukan sebelumnya, tetapi terdapat persamaan dengan penelitian yang telah dilakukan yaitu sebagai berikut:

1. Shcherbak *et al.*, 2013 dalam artikel berjudul “Lactate Dehydrogenase Activity in the Cerebral Cortex and Hippocampus of Mongolian Gerbils in Ischemic and Reperfusion Injuries”. Persamaan dengan penelitian yang akan dilakukan adalah menilai aktivitas atau konsentrasi LDH pada kortek cerebri dan menggunakan ligasi BCCAO. Perbedaannya adalah subjek penelitian saya adalah tikus *Rattus norvegicus* sedangkan penelitian tersebut adalah Mongolian Gerbils, konsentrasi LDH yang dinilai pada penelitian tersebut tidak hanya pada korteks cerebri, akan tetapi juga pada hippocampus.
2. Arandita *et al.*, 2013 dalam artikel berjudul “Aktivitas Enzim Laktat Dehidrogenase pada Jaringan Otak Tikus yang Diinduksi Hipoksia Sistemik”. Persamaan penelitian yaitu menilai konsentrasi enzim laktat dehidrogenase pada jaringan otak dengan ELISA. Perbedaan dengan penelitian yang akan dilakukan adalah jaringan otak yang akan dinilai hanya bagian korteks cerebri, hipoksia otak pada penelitian yang sudah ada dengan *hypoxic chamber* sedangkan yang akan dilakukan dengan ligasi BCCAO, galur tikus yang digunakan yaitu Sprague dawley sedangkan yang akan dilakukan menggunakan tikus galur wistar.
3. Quartu *et al.*, 2017 dalam artikel berjudul “Involvement of the Endocannabinoid System in the Physiological Response to Transient

Common Carotid Artery Occlusion and Reperfusion". Persamaan penelitian yaitu menggunakan teknik ligasi BCCAO dan tikus galur wistar sebagai subjek penelitian, serta durasi reperfusi selama 1 jam. Perbedaan dengan penelitian yang akan dilakukan adalah jaringan yang dinilai korteks frontal, temporal, oksipital dan darah sedangkan yang akan dilakukan hanya menilai jaringan korteks cerebri, konsentrasi zat yang akan dinilai yaitu *endocannabinoids* dan substansi yang memiliki ligand PPAR-alpha sedangkan yang akan dilakukan menilai konsentrasi enzim laktat dehidrogenase, durasi ligasi hanya 30 menit sedangkan yang akan dilakukan memiliki variasi durasi ligasi 5 menit, 10 menit, dan 15 menit.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

4.1. Tinjauan Pustaka

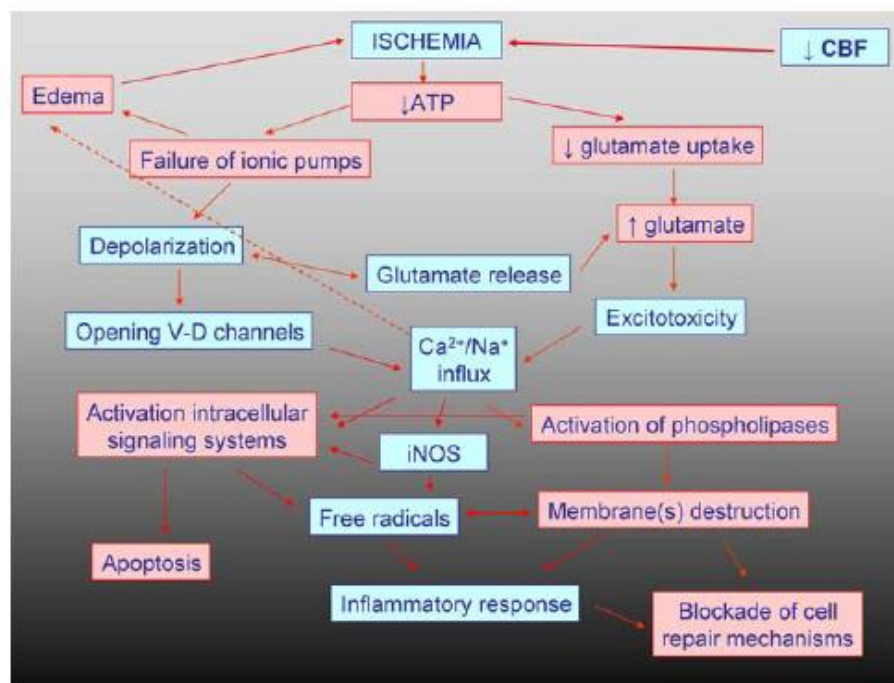
4.1.1. Stroke

Stroke menurut WHO didefinisikan sebagai gangguan fungsional otak fokal maupun global akut lebih dari 24 jam berasal dari gangguan aliran darah otak dan bukan disebabkan oleh gangguan peredaran darah otak sepintas, tumor otak, stroke sekunder karena trauma maupun infeksi. Gangguan aliran di otak tersebut dapat berupa infark cerebral, perdarahan intracerebral, dan perdarahan subaraknoid (Sacco *et al.*, 2013). Defisit neurologik pada stroke terjadi begitu cepat kurang dari 24 jam atau hingga menyebabkan kematian.

Patogenesis stroke dapat disebabkan oleh iskemika atau perdarahan otak. Sebanyak 80% kejadian stroke merupakan stroke iskemik (Lovisa, 2011). Pada stroke iskemik terjadi oklusi fokal pembuluh darah otak yang mengakibatkan suplai oksigen dan glukosa menurun. Oklusi tersebut berupa thrombus, embolus, atau tromboembolus yang mengakibatkan hipoksia atau sampai anoksia pada salah satu cabang yang memperdarahi bagian otak (Setyopranoto, 2011). Penurunan aliran darah ke otak menyebabkan terganggunya penghantaran impuls saraf dan neurotransmitter (Bradley, 2008). Perdarahan yang menyebabkan stroke dapat perdarahan intracerebral atau perdarahan subaraknoid (Setyopranoto, 2011). Perdarahan intracerebral disebabkan rupturnya arteri parenkim otak, sedangkan pada perdarahan subaraknoid disebabkan oleh rupturnya arteri aneurisma otak menuju ruang subaraknoid. Akibat perdarahan tersebut terjadi peningkatan tekanan intrakranial yang akan mendesak pembuluh darah kecil sehingga juga terjadi iskemik (Lovisa, 2011).

Kerusakan pada stroke iskemik melibatkan proses kegagalan energi, eksitotoksik, stress oksidatif, disrupsi *blood brain barrier*, inflamasi, nekrosis, dan apoptosis. Saat parenkim otak mengalami iskemik, terjadi

penurunan ATP (gambar 1). Penurunan ATP menghambat *energy-dependent* $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP enzyme}$ yang mengganggu keseimbangan ion Na^+ , Cl^- dan Ca^{2+} serta terjadi overstimulasi 1-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA), kainite, dan reseptor glutamat N-methyl-d-aspartic acid (NMDA). Proses tersebut menyebabkan lebih banyak pelepasan neurotransmitter glutamate dan influk Ca^{2+} sehingga sel menjadi bengkak dan menginduksi kematian sel. Pada stroke iskemik akut terjadi peningkatan radikal bebas berupa superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radical (OH), nitric oxide (NO) yang menyebabkan kerusakan jaringan. Sebagai respon terhadap peningkatan Ca^{2+} dan radikal bebas, astrosit dan mikroglia memproduksi sitokin proinflamatori seperti IL-1, TNF- α , dan IL-1 β . Selain itu, radikal bebas dan inflamasi mengakibatkan produksi MMPs dan serine proteases yang merusak *blood brain barrier* (Sacco *et al.*, 2013; Secades, 2012). Proses kegagalan energi memicu neuron untuk menggunakan glikolisis anaerob sebagai sumber ATP. Dalam glikolisis anaerob terjadi peningkatan aktivitas enzim laktat dehydrogenase (LDH) (Arandita, 2013).



Gambar 1. Proses iskemia (Secades, 2012)

Terjadinya stroke berhubungan dengan berbagai faktor risiko baik yang bisa dikendalikan, potensi yang bisa dikendalikan, dan tidak bisa dikendalikan. Faktor risiko yang bisa dikendalikan yaitu hipertensi, penyakit jantung, fibrilasi atrium, endocarditis, stenosis mitralis, infark jantung, merokok, anemia sel sabit, *transient ischemic attack*, dan stenosis karotus asimtomatik. Faktor risiko seperti diabetes mellitus, hiperhomosisteinemia, dan hipertrofi ventrikel kiri cenderung sulit dikendalikan. Sedangkan faktor risiko yang tidak bisa dikendalikan adalah umur, jenis kelamin, herediter, ras, etnis, dan geografi (Setyopranoto, 2011).

Gejala dan tanda baik fokal maupun global timbul akibat aliran darah otak yang menurun (Setyopranoto, 2011). Penurunan suplai darah baik akibat iskemik maupun perdarahan menimbulkan gejala dan tanda berupa hemidefisit motorik, hemidefisit sensorik, penurunan kesadaran, kelumpuhan nervus fasialis (VII) dan hiploglosus (XII), gangguan fungsi luhur seperti afasia dan gangguan fungsi intelektual, buta separuh lapang pandang (*hemianopsia*), dan defisit batang otak. Gangguan fungsi intelektual yang timbul dapat berupa demensia (De Freitas *et al.*, 2009).

4.1.2. Korteks Cerebri

Korteks cerebri merupakan bagian terluar dari permukaan cerebri (Liem, 2010). Bagian ini terdiri dari substansia grisea. Fungsi dari korteks cerebri bergantung pada areanya. Pada korteks motorik primer yaitu area 4, 6, dan 8 berfungsi mengatur gerakan volunter otot dan tulang pada sisi tubuh kontralateral. Korteks sensorik primer pada area 3, 4, dan 5 berfungsi menerima impuls sensorik dari kulit, otot, dan tendo sisi kontralateral. Selain terdapat area sensori dan motorik, pada korteks cerebri juga terdapat area asosiasi yang menghubungkan area sensori dan motorik. Area ini terdiri atas area frontal, temporal, dan parieto-oksipital. Pada area 17 korteks cerebri berfungsi sebagai korteks visual yang mempersepsikan gambar. Korteks auditorik primer yaitu area 41 pada bagian transversal girus temporal

menerima impuls auditori untuk mempersepsikan suara. Pada lobus temporalis selain terdapat korteks auditorik primer juga terdapat area penghidu yaitu pada girus parahipotalamus lobus temporalis berfungsi untuk mempersepsikan bau. Jika terjadi lesi pada area ini penderita akan menghidu bau dan mengecap rasa yang aneh (Syaifuddin, 2011).

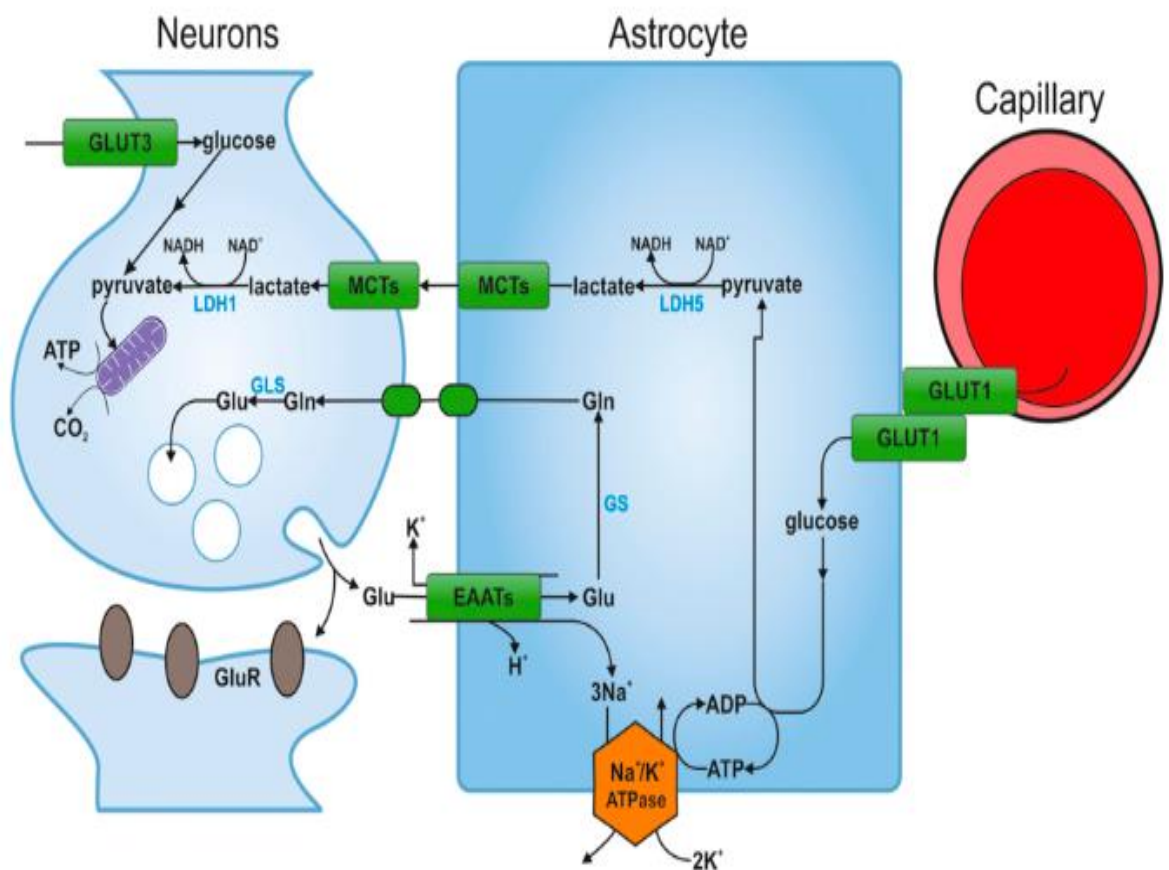
Tingginya kebutuhan energi sel neuron otak, menyebabkan pada keadaan infrakerebri terjadi kerusakan area otak yang berbeda berdasarkan sensitivitasnya. Bagian pada otak yang rentan terhadap iskemik adalah hipocampus area CA1, korteks cerebri, dan striatum (Shcherbak *et al.*, 2013). Korteks cerebri yang rentan terutama pada lobus parietal dan lobus oksipital. Neuron dominan penyusun korteks cerebri adalah sel stelate (granular) dan sel piramidal yang menyusun 2/3 bagian (Prayson, 2011). Sel piramidal menyusun seluruh 6 lapisan korteks cerebri kecuali lapisan I (Chan *et al.*, 2001). Diantara keenam lapisan, lapisan III, V, VI merupakan lapisan yang lebih rentan terhadap iskemik dan hipoksia (Caplan, 2016).

Dibanding dengan substansi alba, korteks yang terdiri dari substansia grisea memiliki lebih banyak kapiler. Jika terjadi infrakerebri, maka terdapat lebih banyak perdarahan multifokal pada korteks cerebri. Substansia grisea memanfaatkan 2,5 kali ATP lebih banyak dibanding substansi alba sehingga kerusakan lebih banyak terjadi pada korteks cerebri (Agamanolis, 2013).

4.1.3. Enzim Laktat Dehidrogenase

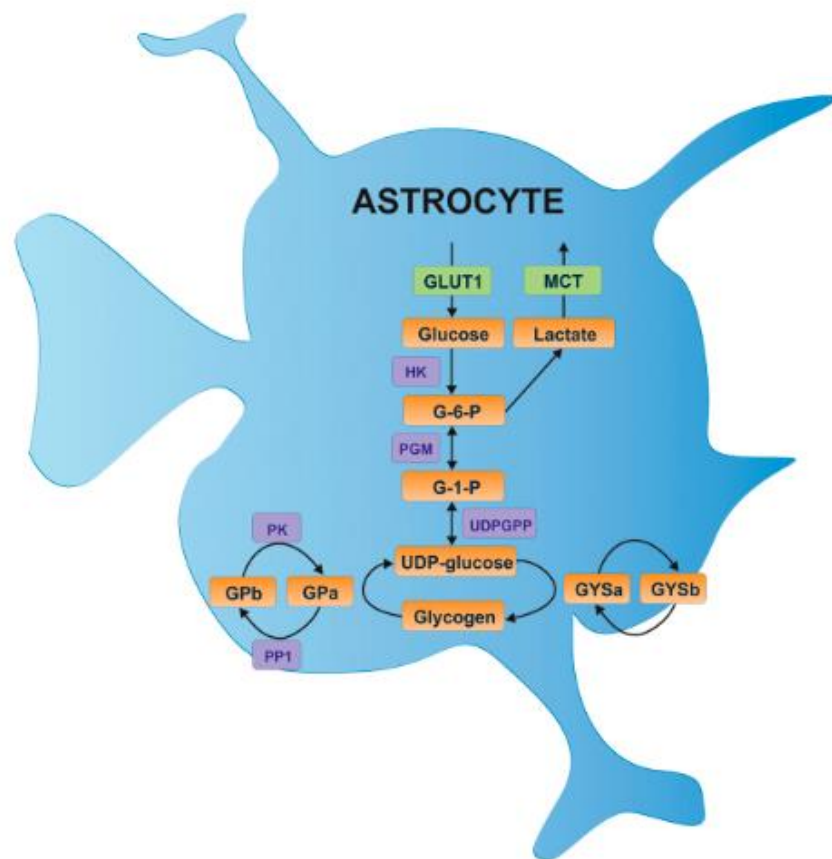
Ketika otak dalam keadaan hipoksia seperti pada stroke iskemik, terjadilah peningkatan aktivitas enzim laktat dehidrogenase yang berfungsi dalam menghasilkan energi melalui reaksi glikolisis anaerob (Arandita *et al.*, 2013). Laktat dehidrogenase dilepaskan keluar sel apabila membran sel ruptur akibat proses apoptosis dan nekrosis pada otak yang iskemik (Chan *et al.*, 2013).

Dalam kondisi normal ketika suplai oksigen dan glukosa ke otak dalam jumlah yang adekuat, astrosit mengubah glukosa menjadi glikogen dan laktat. Laktat yang dihasilkan astrosit dapat terbentuk melalui glukosa yang diubah menjadi piruvat kemudian menjadi laktat oleh enzim laktat dehidrogenase isoenzim 5 (LDH5) (gambar 2) atau melalui glukosa yang diubah menjadi glikogen sebagai cadangan glukosa dan akhirnya menjadi laktat (gambar 3). Dalam kondisi normal, neuron memiliki pilihan untuk menggunakan glukosa atau laktat sebagai sumber ATP (Falkowska *et al.*, 2015). Neuron lebih banyak memanfaatkan glukosa ketika dalam keadaan istirahat dan menggunakan laktat ketika beraktivitas (Khalilov *et al.*, 2014).



Gambar 2. Perubahan piruvat menjadi laktat di dalam astrosit dan konsumsi laktat oleh neuron (Falkowska *et al.*, 2015).

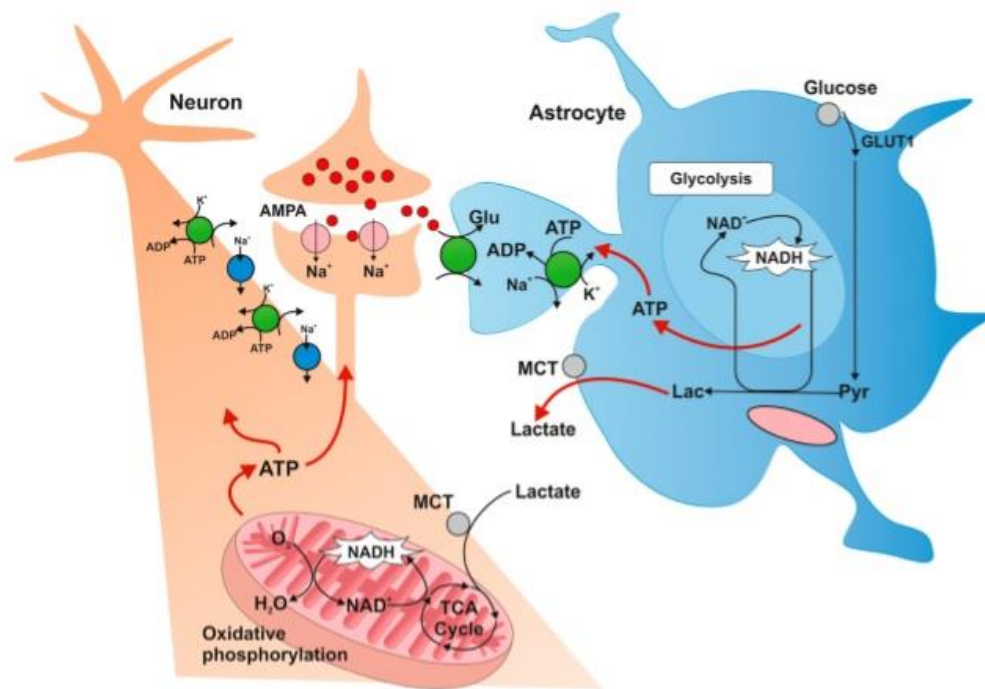
Saat terjadi penurunan suplai aliran darah ke otak, glukosa sebagai sumber energi utama otak akan berkurang. Berkurangnya ketersediaan glukosa memicu metabolise glikogen yang merupakan cadangan glukosa intrasel. Glikogen kemudian dimetabolisme menjadi laktat. Laktat selanjutnya dimetabolisme menjadi piruvat oleh enzim laktat dehidrogenase isoenzim 1 (LDH1) untuk dapat masuk dalam siklus krebs dan menghasilkan ATP (gambar 4). Pada proses iskemik terjadi peningkatan metabolisme laktat (Falkowska *et al.*, 2015). Hal ini menunjukkan laktat menjadi sumber energi alternatif ketika jumlah glukosa tidak adekuat (Khalilov *et al.*, 2014).



Gambar 3. Perubahan glikogen menjadi laktat (Falkowska *et al.*, 2015)

Dalam mendiagnosis stroke, laktat dan laktat dehidrogenase (LDH) telah banyak digunakan sebagai biomarker adanya kematian sel. Konsentrasi

laktat pada cairan cerebrospinal meningkat saat terjadi iskemik dan hemoragik cerebral. Demikian pula konsentrasi LDH, sensitivitas LDH akan tinggi pada iskemik cerebral dan iskemik perinatal. Peningkatan konsentrasi laktat dan LDH sebanding dengan luas lesi (Topic, 2016). Tidak hanya pada cairan cerebrospinal, LDH juga telah banyak dinilai konsentrasinya pada serum sebagai biomarker stroke (Parakh *et al.*, 2002).



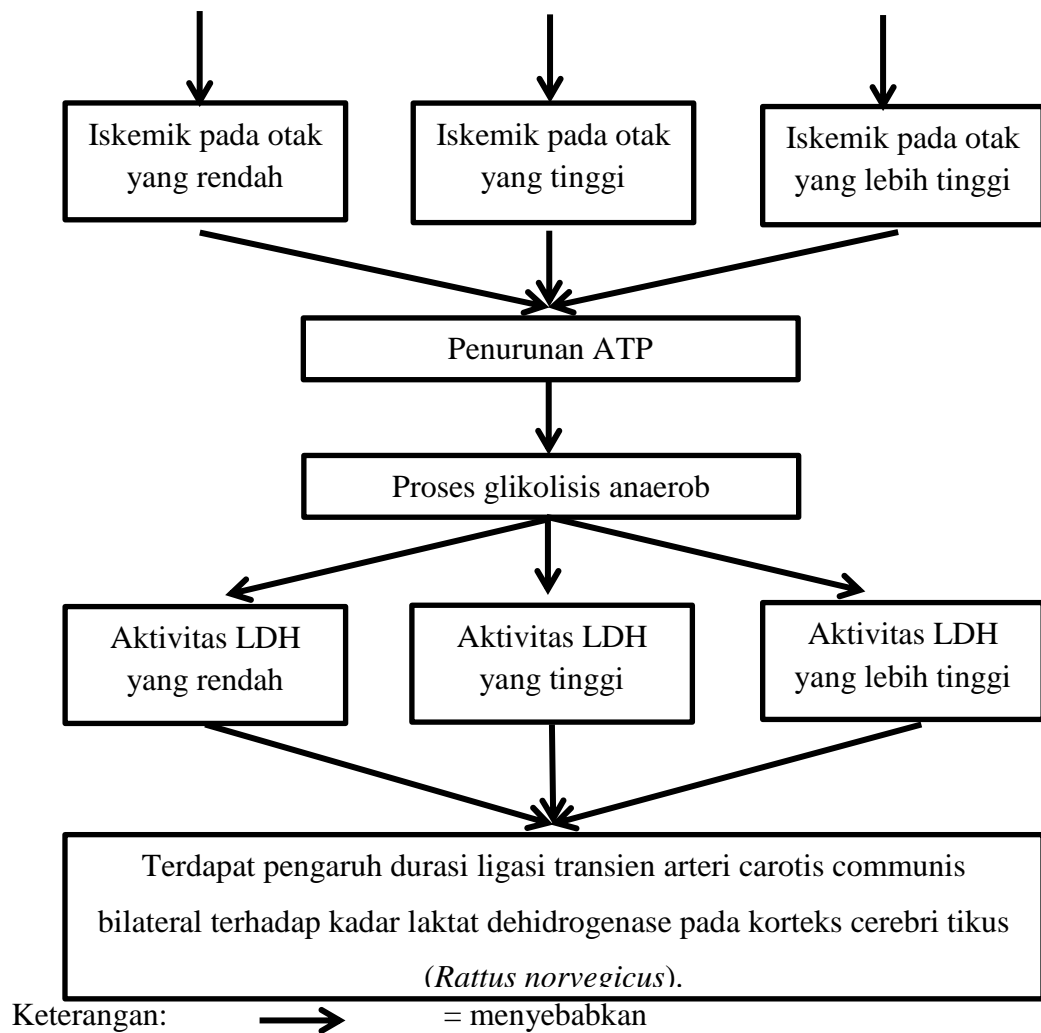
Gambar 4. Metabolisme laktat dalam sel neuron (Falkowska *et al.*, 2015).

4.2. Kerangka Teori

Berdasar tinjauan pustaka diatas dapat dirumuskan kerangka teori berikut:

Gambar 5. Kerangka teori

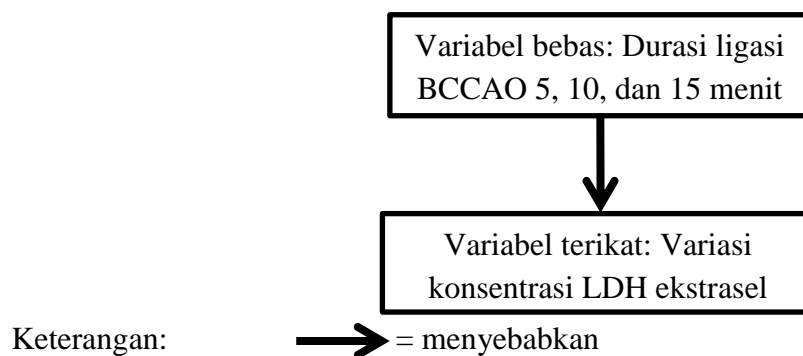




4.3. Kerangka Konsep

Berdasar tinjauan pustaka dan kerangka teori maka dapat dibuat kerangka konsep seperti berikut:

Gambar 6. Kerangka konsep



4.4. Hipotesis

Berdasar tinjauan pustaka, kerangka teori, dan kerangka konsep diatas maka dapat dibuat sebuah hipotesis yaitu:

Terdapat perbedaan kadar laktat dehidrogenase pada korteks cerebri tikus (*Rattus norvegicus*) dengan variasi durasi ligasi transien arteri carotis communis bilateral.

BAB III

METODE PENELITIAN

7.1. Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental kuasi (*quasi experiment*) dengan menggunakan rancangan *post test control group design*.

7.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan berlangsung selama enam bulan. Tempat penelitian adalah laboratorium fisiologi dan laboratorium riset Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

7.3. Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah tikus jantan usia sekitar 2 bulan dengan spesies *Rattus norvegicus* galur wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak memenuhi kriteria eksklusi. Berat tikus berkisar 100-150 gram. Tikus yang digunakan mengambil dari tikus yang ditenakkan laboratorium FK UII.

Kriteria inklusi subjek penelitian yaitu tikus jantan yang sehat dengan ciri-ciri kondisi bulu yang baik, tidak cacat, makan, minum, dan tidur sesuai siklus. Kondisi bulu yang baik ditandai dengan kondisi bulu yang bersih, tidak basah, dan tidak lengket. Kriteria eksklusi yaitu tikus yang mati selama penelitian berlangsung.

Jumlah sampel penelitian menggunakan rumus *Festing Resource Equation* (Charan & Kantharia, 2013) yaitu:

$$\begin{aligned} E &= N - T \\ E &= (n \times T) - T \\ 20 &= (n \times 4) - 4 \\ 6 &= n \end{aligned}$$

Keterangan :

E = komponen eror

N = jumlah total sampel

T = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

Nilai E yang adekuat berkisar antara 10 – 20 (Charan & Kantharia, 2013). Pada penelitian ini, nilai E yang digunakan adalah 20 dan sampel akan dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan sehingga jumlah sampel tiap kelompok perlakuan yang adekuat adalah 6 ekor tikus. Adapun kelompok pada penelitian ini adalah:

- 1) Kelompok 1 adalah kelompok *sham* yaitu tikus mengalami insisi tanpa ligasi arteri carotis communis bilateral dan reperfusi 1 jam.
- 2) Kelompok 2 adalah kelompok perlakuan ligasi transien arteri carotis communis bilateral dengan durasi 5 menit dan reperfusi 1 jam.
- 3) Kelompok 3 adalah kelompok perlakuan ligasi transien arteri carotis communis bilateral dengan durasi 10 menit dan reperfusi 1 jam.
- 4) Kelompok 4 adalah kelompok perlakuan ligasi transien arteri carotis communis bilateral dengan durasi 15 menit dan reperfusi 1 jam.

7.4. Variabel Penelitian

7.4.1. Variabel Terikat

Variabel terikat yaitu kadar enzim laktat dehidrogenase (LDH) pada korteks tikus *Rattus norvegicus* dengan ligasi transien arteris carotis communis bilateral.

7.4.2. Variabel Bebas

Variabel bebas yaitu durasi ligasi transien arteri carotis communis bilateral (BCCAO) pada tikus *Rattus Norvegicus*.

7.5. Definisi Operasional

- 1) Kadar enzim laktat dehidrogenase (LDH) korteks cerebri adalah konsentrasi enzim laktat dehidrogenase (LDH) dari sampel 2/3 bagian belakang korteks cerebri tikus diukur dengan pemeriksaan menggunakan antibodi anti LDH pada Elisa yang dibaca melalui *microplate reader* dan dinyatakan berupa data numerik dengan satuan ng/ml.
- 2) Durasi ligasi transien arteri carotis comunis bilateral adalah lamanya pengikatan arteri carotis comunis bilateral dengan benang *catgut* dan *silk* selama 5, 10, atau 15 menit dan periode reperfusi 1 jam.

7.6. Alat dan Bahan Penelitian

7.6.1. Alat Penelitian

- 1) Kandang untuk setiap kelompok tikus
- 2) Alat bedah minor
- 3) Meja operasi steril
- 4) Aluminium foil
- 5) Lampu
- 6) Perekat
- 7) Kapas
- 8) Pot organ
- 9) Jarum suntik
- 10) Benang silk
- 11) Benang *catgut*
- 12) *Infusion set*
- 13) Mikrotom
- 14) Kaca objek
- 15) Termometer
- 16) Inkubator 37°C
- 17) *Beaker glass*
- 18) Tabung eppendorf
- 19) *Sigle* dan *multichannel* pipet

20) *Disposable tips*

21) *Microplate reader 450 nm*

7.6.2. Bahan Penelitian

- 1) Tikus jantan *Rattus norvegicus* sebanyak 24 ekor
- 2) *Rat Ldhb (L- lactate dehydrogenase B chain) Elisa Kit*
- 3) NaCl 0,9%
- 4) Obat anestesi (Ketamin)
- 5) Bahan desinfeksi (Povidon Iodin)
- 6) Pakan tikus standar (AD II)
- 7) Aquades

7.7. Tahap Penelitian

7.7.1. Persiapan Hewan Coba

Persiapan hewan coba dilakukan dengan mengadaptasikan tikus pada lingkungan baru. Masing- masing tikus diletakkan dalam kandang ukuran 40x20x20 cm³ secara terpisah selama 1 minggu. Cahaya dalam diatur dengan siklus terang dari pukul 06.00 hingga 18.00 dan siklus gelap mulai pukul 18.00 sampai 06.00. Suhu kandang diukur sesuai suhu kamar. Tikus diberi pakan setiap pagi hari dan air minum secara *ad libitum*.

7.7.2. Ligasi Arteri Carotis Communis

Sebelum dilakukan ligasi arteri carotis communis bilateral, tikus terlebih dahulu ditimbang dengan neraca O'hauss dan dianestesi dengan ketamine 80-100 mg/kgBB intramuskular. Kemudian dilakukan pengukuran suhu rektal dengan termometer dan atur agar suhu rektal tetap 37±1°C. Langkah-langkah ligasi arteri carotis communis bilateral adalah :

- 1) Area yang akan dilakukan insisi pada permukaan leher anterior tikus didesinfektan dengan menggunakan povidon iodine untuk mencegah infeksi.

- 2) Pada permukaan leher anterior bagian medial tikus dilakukan insisi secara vertikal.
- 3) Setelah dilakukan insisi, arteri carotis communis ditelusuri dengan melakukan eksplorasi kedalam tanpa memotong glandula submandibularis sampai terlihat arteri carotis communis dengan ciri-ciri berdenyut dan berwarna merah terang.
- 4) Setelah menemukan arteri carotis communis dilakukan pemisahan arteri dengan nervus vagus agar tidak terjadi reflek vagus yang dapat menyebabkan kematian.
- 5) Arteri carotis communis diligasi dengan menggunakan benang silk dan *catgut* selama 5, 10, atau 15 menit.
- 6) Setelah diligasi selama waktu yang ditentukan, ligasi kembali dilepas dan dilakukan penjahitan dengan benang *catgut* untuk menutup area insisi.

7.7.3. Perlakuan *Sham Operated*

Pada kelompok *sham* dilakukan insisi tanpa dilakukan ligasi arteri carotis communis bilateral. Langkah yang dilakukan yaitu:

- 1) Area yang akan dilakukan insisi pada permukaan leher anterior tikus didesinfektan dengan menggunakan povidon iodine untuk mencegah infeksi.
- 2) Pada permukaan leher anterior bagian medial tikus diinsisi secara vertikal.
- 3) Arteri carotis communis ditelusuri dengan melakukan eksplorasi kedalam tanpa memotong glandula submandibularis sampai terlihat arteri carotis communis dengan ciri-ciri berdenyut dan berwarna merah terang.
- 4) Pada daerah insisi dilakukan penjahitan untuk mempercepat penyembuhan luka.

7.7.4. Eutanasia

Eutanasia dilakukan 1 jam setelah melakukan penjahitan pasca ligasi arteri carotis communis bilateral dalam keadaan masih teranastesi. Cara yang dilakukan adalah melakukan insisi secara horizontal mulai dari linea aksila dekstra hingga aksila sinistra melintasi batas bawah abdomen. Selanjutnya melepaskan kulit kearah thorak hingga terlihat jantung. Kanula infus yang berisi NaCl kemudian dimasukkan ke jantung untuk melakukan perfusi transkardial. Pada atrium kiri dilakukan insisi untuk mempercepat aliran darah keluar jantung mencapai seluruh organ tikus. Setelah semua organ tampak pucat tidak kemerahan hentikan perfusi.

7.7.5. Pengambilan Spesimen

Pengambilan spesimen dimulai dengan melakukan insisi untuk memisahkan kepala dan thorak tikus. Kemudian dilakukan dekapitasi untuk mengambil otak tikus. Hemisfer otak kanan dan kiri dipisahkan. Hemisfer kiri diambil untuk dicuci dengan PBS dingin. Bagian 1/3 anterior hemisfer otak dipotong untuk diambil bagian korteks prefrontal, sedangkan 2/3 sisanya diisolasi dari bagian hippocampus dan diambil korteksnya. Berat 2/3 bagian posterior otak setelah diambil hippocampusnya (korteks) ditimbang. Bagian korteks kemudian dihancurkan hingga halus dan ditambahkan PBS sesuai berat dengan perbandingan 1 gram jaringan dengan 9 ml PBS. Spesimen kemudian disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit.

7.7.6. Pengukuran Kadar LDH Korteks

Kadar LDH korteks diukur menggunakan Elisa Kit untuk LDH. Langkah yang dilakukan yaitu:

- 1) *Plate* yang terdiri dari 96 sumuran dicuci dengan melarutkan 30 mL *concentrated wash buffer* dalam 750 mL *wash buffer* yang telah diionisasi atau disuling air sebanyak 2 kali.

- 2) Setelah *96well plate* dicuci, 100 μ L larutan standar 100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.25ng/ml, 3.125ng/ml, dan 1.56ng/ml dimasukkan ke dalam sumuran standar.
- 3) Selain memasukkan 100 μ L larutan standar ke dalam sumuran standar, 100 μ L pengenceran penyangga sampel atau standar dimasukkan ke dalam sumuran kontrol.
- 4) Larutan sampel sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam sumuran sampel.
- 5) Sumuran ditutup dengan *plate sealer* dan inkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C.
- 6) Setelah ditutup, cairan dalam sumuran dihisap dengan kertas penghisap.
- 7) Sebanyak 100 μ L *biotin detection antibody working solution* ditambahkan pada setiap sumuran, tutup kembali, dan inkubasi 60 menit pada suhu 37°C.
- 8) Larutan pada setiap sumuran diaspirasi dan sumuran dicuci kembali sebanyak 3 kali.
- 9) *SABC working solution* sebanyak 100 μ L dimasukkan pada setiap sumuran, kemudian ditutup dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.
- 10) Larutan diaspirasi kembali dan sumuran dicuci sebanyak 5 kali.
- 11) Sebanyak 90 μ L substrat TMP dimasukkan, kemudian sumuran ditutup kembali, dan diinkubasi selama 15-30 menit pada suhu 37°C. Cairan akan berubah menjadi warna biru.
- 12) Untuk menghentikan reaksi, sebanyak 50 μ L larutan penyetop dimasukkan dan larutan berubah warna menjadi kuning.

Hasil yang diperoleh dibaca menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 450nm segera setelah ditambah larutan penyetop.

7.8. Analisis Data

Data yang diperoleh akan diuji normalitas terlebih dahulu dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas varians dengan uji *Levene's test*. Jika data terdistribusi normal dan homogen dilakukan analisis komparasi dengan uji One Way ANOVA untuk mengetahui pengaruh durasi ligasi transien arteri carotis communis terhadap kadar laktat dehidrogenase pada korteks cerebri tikus (*Rattus norvegicus*). *Confident Interval (CI)* yang digunakan 95% ($\alpha = 0.05$).

7.9. Etika Penelitian

Uji kode etik penelitian ini diajukan ke Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

11.1. Hasil

11.1.1. Karakteristik Subjek

Penelitian yang dilakukan telah lolos kaji etik. Keterangan lolos kaji etik dikeluarkan oleh Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan nomer 13/Ka.Kom.Et/70/KE/VII/2017. Penelitian telah dilakukan selama tujuh bulan. Durasi tersebut lebih panjang dari yang direncanakan yaitu enam bulan.

Subjek penelitian yang digunakan adalah dua puluh empat ekor tikus jantan *Rattus norvegicus* galur wistar usia 2 bulan. Tikus yang digunakan telah memenuhi kriteria inklusi dan tidak memiliki kriteria eksklusi. Adapun kriteria inklusi tikus jantan yang sehat dengan ciri-ciri kondisi bulu yang baik, tidak cacat, makan, minum, dan tidur sesuai siklus. Sedangkan kriteria eksklusi adalah tikus yang mati selama penelitian berlangsung. Berat rata-rata tikus yang digunakan yaitu 125 gram.

Seperti telah disebutkan dalam metode penelitian, dua puluh empat ekor tikus telah dibagi kedalam 4 kelompok dengan masing-masing kelompok berjumlah 6 ekor sesuai dengan jumlah minimal sampel menggunakan rumus *Festing Resource Equation*. Pada kelompok 1 atau kelompok *sham*, tikus tidak mendapat perlakuan ligasi ligasi arteri carotis communis bilateral kemudian dilakukan reperfusi selama 1 jam. Kelompok 2 mendapat perlakuan ligasi transien arteri carotis communis bilateral selama 5 menit kemudian dilakukan reperfusi selama 1 jam. Kelompok 3 mendapat perlakuan ligasi transien arteri carotis communis bilateral selama 10 menit kemudian dilakukan reperfusi selama 1 jam. Kelompok 4 mendapat perlakuan ligasi transien arteri carotis communis bilateral selama 15 menit kemudian dilakukan reperfusi selama 1 jam.

11.1.2. Hasil Pemeriksaan Kadar LDH

Pemeriksaan kadar LDH dilakukan setelah didapatkan sampel dari masing-masing kelompok. Tikus pada masing-masing kelompok mendapat perlakuan ligasi transien arteri carotis communis dengan durasi waktu yang berbeda. Setelah itu, ligasi transien arteri carotis communis dibuka kembali dan selanjutnya dilakukan reperfusi selama 1 jam. Setelah reperfusi selama 1 jam, dilakukan eutanasia dengan cara perfusi transkardial menggunakan NaCl.

Sampel yang digunakan adalah korteks cerebri yang diambil melalui proses dekapitasi. Setelah dilakukan dekapitasi, cerebrum hemisfer kanan dan kiri dipisahkan. Bagian 2/3 posterior cerebrum hemisfer kiri diisolasi dan dipisahkan dari hipocampus untuk mengambil bagian korteks cerebri dan digunakan sebagai sampel. Korteks ditimbang dan dihancurkan hingga lembut. Selanjutnya korteks yang telah dihancurkan hingga lembut ditambahkan PBS dengan perbandingan 1 gram jaringan dengan 9 ml PBS. Sampel korteks yang telah hancur dan ditambahkan PBS disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Sampel disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -20°C sebelum diperiksa kadar LDH-nya.

Pemeriksaan yang dilakukan terhadap sampel adalah pemeriksaan kadar LDH dengan ELISA. Pada pemeriksaan menggunakan rat ELISA kit didapatkan standar dapat diproses secara normal. Hal ini merupakan indikator bahwa ELISA kit berfungsi secara normal.

Analisis data dilakukan setelah keterangan lolos kaji etik dikeluarkan oleh Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Data terlebih dahulu diuji distribusinya dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas varians dengan uji *Levene's test*. Hasil uji Saphiro Wilk menunjukkan data pada semua kelompok mengikuti distribusi normal ($p > 0.05$). Pada uji variansi dengan uji *Levene's test* diperoleh data memiliki varian sama atau variansi homogen dengan nilai $p = 0.574$ ($p > 0.05$).

Data selanjutnya dianalisis dengan menggunakan analisis komparasi dengan uji One Way ANOVA karena memenuhi syarat untuk dilakukan uji One Way ANOVA yaitu data mengikuti distribusi normal dan uji variansi homogen. Uji dilakukan untuk mengetahui apakah ada pengaruh durasi ligasi transien BCCAO terhadap kadar LDH masing-masing kelompok dan apakah ada perbedaan bermakna dari masing-masing kelompok.

Tabel 1. Rata-rata \pm SEM kadar LDH korteks

	Kelompok I (rata-rata \pm SEM)	Kelompok II (rata-rata \pm SEM)	Kelompok III (rata-rata \pm SEM)	Kelompok IV (rata-rata \pm SEM)	p*
Kadar LDH (ng/ml)	1.31 \pm 0.34	1.15 \pm 0.25	1.48 \pm 0.31	1.26 \pm 0.30	0.332

Kelompok I: kelompok *sham-operated*, kelompok II: teknik BCCAO durasi ligasi 5 menit, kelompok III: teknik BCCAO durasi ligasi 10 menit, kelompok IV: teknik BCCAO durasi ligasi 15 menit

*nilai p diuji menggunakan uji *one way* ANOVA

Dari pengukuran kadar LDH didapatkan terdapat peningkatan kadar LDH pada kelompok III dan VI dibandingkan dengan kelompok kontrol tetapi kadar LDH kelompok II lebih rendah dibanding kelompok I. Kadar LDH tertinggi yaitu kadar LDH kelompok III. Uji One Way ANOVA menunjukkan nilai $p = 0.332$ ($p > 0.05$) yaitu tidak ada perbedaan bermakna kadar LDH pada tiap kelompok.

11.2. Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan teknik ligasi transien BCCAO untuk mengetahui pengaruh durasi ligasi terhadap perubahan kadar LDH korteks cerebri. Teknik BCCAO merupakan teknik mengiduksi iskemi dengan meligasi arteri carotis communis bilateral. Ketika arteri carotis dekstra dan sinistra diligasi maka akan muncul proses iskemia global pada cerebrum (IBRC, 2013). Ligasi akan menurunkan perfusi aliran darah ke otak mengakibatkan penurunan suplai oksigen yang akan berlanjut menjadi iskemi.

Proses ini akan mengganggu fungsi dan metabolisme otak tikus (Farkas *et al.*, 2007; Bacigaluppi *et al.*, 2010).

Adanya perubahan metabolisme otak menyebabkan kegagalan energi neuron yang meningkatkan glikolisis anaerob dan aktivitas enzim laktat dehidrogenase (Arandita, 2013). Laktat dehidrogenase dilepaskan ke ekstraselular ketika iskemi karena sel mengalami apoptosis dan nekrosis yang selanjutnya ruptur (Chan *et al.*, 2013).

Ketika kadar oksigen neuron menurun pada proses iskemia terjadilah penurunan proses respirasi seluler dalam mitokondria yang selanjutnya mendorong proses fosforilasi oksidatif pada pembentukan ATP. Neuron akan melakukan glikolisis anaerob yang meningkatkan kadar LDH di dalam dan di luar sel. Laktat dehidrogenase merupakan enzim yang mengkatalisasi piruvat menjadi laktat maupun sebaliknya (Khalilov *et al.*, 2014). Proses yang terjadi selama iskemi ini sama dengan proses yang terjadi pada ligasi BCCAO. Perubahan kadar dan aktivitas LDH pada berbagai struktur otak akan terjadi selama proses iskemia dan periode reperfusi (Shcherbak *et al.*, 2013). Oleh karena itu pada penelitian ini, durasi ligasi BCCAO divariasikan mulai dari 5, 10, hingga 15 menit menggambarkan lamanya durasi iskemia yang diharapkan menunjukkan perubahan kadar LDH.

Ketika suplai oksigen dan glukosa ke otak dalam jumlah yang adekuat, astrosit mengubah glukosa menjadi glikogen dan laktat. Neuron memiliki pilihan untuk menggunakan glukosa atau laktat sebagai sumber ATP saat kondisi normal (Falkowska *et al.*, 2015). Neuron lebih banyak memanfaatkan glukosa ketika dalam keadaan istirahat dan menggunakan laktat ketika beraktivitas (Khalilov *et al.*, 2014). Hal tersebut dapat menjelaskan mengapa pada kelompok I atau *sham* terdapat kadar LDH yang menunjukkan bahwa dalam keadaan normal LDH tetap diproduksi.

Pada penelitian ini, kelompok II memiliki kadar LDH yang lebih rendah dibandingkan kelompok I. Durasi ligasi 5 menit belum menunjukkan hasil kadar LDH yang lebih tinggi dibandingkan kelompok tikus yang tidak diligasi. Hal ini menunjukkan bahwa durasi ligasi 5 menit belum mampu menaikkan kadar LDH yang merupakan indikator adanya proses iskemi. Hasil

ini berbeda dengan penelitian sebelumnya pada hipocampus. Pada hipocampus, ligasi BCCAO selama 5 menit telah mampu menaikkan kadar LDH dibandingkan kontrol namun tidak signifikan. Pada ligasi 5 menit proses glikolisis anaerob sudah terjadi pada bagian hipocampus tetapi belum pada korteks cerebri. Area hipocampus sendiri merupakan area yang lebih rentan pada kondisi iskemia dengan teknik BCCAO (Bacigaluppo *et al.*, 2010). Sedangkan korteks cerebri juga merupakan area yang rentan terhadap iskemi dengan urutan ketiga setelah hipocampus dan area CA1 (Shcherbak *et al.*, 2013). Kadar LDH kelompok II yang lebih rendah dibanding kelompok I menunjukkan bahwa ketika terjadi penurunan suplai oksigen dan glukosa ke neuron maka neuron berusaha melakukan adaptasi dengan memanfaatkan LDH yang telah ada untuk dapat mengkompensasi produksi ATP yang adekuat (Khalilov *et al.*, 2014).

Hasil kadar LDH kelompok III dengan durasi ligasi 10 menit menunjukkan kadar LDH tertinggi dibanding semua kelompok. Hal ini menunjukkan bahwa pada durasi ligasi 10 menit terjadi peningkatan proses glikolisis anaerob yang meningkatkan kadar LDH dan laktat sebagai produk antara sebagai kompensasi semakin sedikitnya ATP dari proses aerob. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian sebelumnya dan penelitian Bacigaluppi *et al.* pada tahun 2010 yang dilakukan dengan mengukur kadar LDH hipocampus. Ligasi BCCAO selama 10 menit menyebabkan kematian neuron hipocampus pada Mongolian gerbils akibat terganggunya sirkulasi willisi (Bacigaluppi *et al.*, 2010).

Pada durasi ligasi 15 menit kelompok IV menunjukkan peningkatan kadar LDH dibanding kelompok I tetapi lebih rendah dari kelompok III. Hal ini menunjukkan bahwa pada pengukuran kadar LDH dengan ELISA kit, kadar LDH yang diukur adalah LDH bebas ekstrasel melalui ikatan antara antigen dengan antibodi. Laktat dehidrogenase sendiri merupakan enzim yang untuk dapat mengkatalisis perubahan piruvat menjadi laktat atau sebaliknya harus berikatan dengan reseptor terlebih dahulu. Ketika durasi ligasi 10 menit, LDH banyak dikeluarkan dari sel sebagai mekanisme kompensasi ATP dan oksigen yang semakin menurun kemudian selanjutnya enzim tersebut akan

berikatan pada reseptor. Oleh sebab itu pada pemeriksaan LDH dengan durasi ligasi 15 menit, kadar LDH lebih rendah dibanding 10 menit tetapi tetap lebih tinggi dibanding ketika tidak iskemi (Khalilov *et al.*, 2014; Lampl *et al.*, 1989; Shcherbak *et al.*, 2013). Adanya perbedaan kadar LDH pada kelompok I, II, III, dan IV yang berfluktuasi menunjukkan mekanisme respon adaptasi terhadap iskemia sel neuron bukan akibat nekrosis dan rupturnya sel neuron (Khalilov *et al.*, 2014; Falkowska *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016).

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

16.1. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan tidak terdapat perbedaan kadar laktat dehidrogenase pada korteks cerebri tikus (*Rattus norvegicus*) dengan variasi durasi ligasi transien arteri carotis communis bilateral. Hal tersebut berdasarkan hasil uji statistik One Way ANOVA yang menunjukkan nilai p 0.332.

Pada kelompok III dengan durasi ligasi 10 menit menunjukkan kadar LDH yang paling tinggi dibanding kelompok kontrol dan kelompok ligasi lainnya. Kadar LDH pada kelompok I hingga kelompok IV memiliki pola naik turun. Kelompok II dan IV memiliki kadar LDH yang lebih rendah dari kadar LDH kelompok I atau kelompok *sham operated*.

16.2. Saran

Saran yang diusulkan penulis adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui berapakah durasi ligasi dan reperfusi teknik BCCAO yang dapat mulai menunjukkan peningkatan kadar LDH pada kortek cerebri tikus.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk melihat efek durasi ligasi teknik BCCAO terdapat korteks cerebri dengan indikator yang berbeda seperti imunohistokimiawi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agamanolis, D.P., 2013. Hypoxic-Ischemia and Stroke. *Neuropathology-web.org/chapter2/chapter2aHIE.html* [diupdate April 2013, diakses pada tanggal 16 Februari 2017]
- AHA, 2015, *Heart Disease and Stroke Statistics At a Glance*, American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, Amerika, 1-4.
- Arandita R. T, Prijanti A.R., Sadikin M., 2013, Aktivitas Enzim Laktat Dehidrogenase pada Jaringan Otak Tikus yang Diinduksi Hipoksia Sistemik, *FK-UI*, 1-16.
- Bacigaluppi, M., Comi, G., Hermann, D.M., 2010, Animal Models of Ischemic Stroke, Part two: Modeling Cerebral Ischemia, *The Open Neurology Journal*, Volume 4: 34-38.
- Bradley W.G., 2008, *Neurology in Clinical Practice*, Elsevier, Philadelphia.
- Caplan, L.R., 2016, *Caplan's Stroke: A Clinical Approach*, Cambridge University Press, United Kingdom.
- CDC, 2009, Know the Fact about Stroke, https://www.cdc.gov/stroke/docs/consumered_stroke.pdf [diupdate 2009, diakses pada tanggal 1 Januari 2017]
- Chan C.H., Godinho L.N., Thomaidou D., Tan S.S., Gulisano M., Parnavelas J.G., 2001, Emx1 is a Marker for Pyramidal Neurons of the Cerebral Cortex, *Oxford University Press*, Volume 11: 1191-1198.
- Chan F.K.M, Moriwaki K., De Rosa M.J., 2013, Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity, *Methods in Molecular Biology Journal*, Volume 979: 65-70.
- Charan J., Kantharia N.D., 2013, How to calculate sample size in animal studies?, *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, Volume 4: 303-306 October- Desember, 2013 Number 4.
- De Freitas G. R., Christoph D. D. H., Bogousslavsky J., 2009, *Topographic Classification of Ischemic Stroke in Fisher M. (ed). Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier BV.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2013, *Situasi Kesehatan Jantung*, Kementerian Kesehatan RI Pusat Data dan Informasi, Jakarta.
- Falkowska A., Gutowska I., Goschorska M., Nowacki P., Chlubek D., Bosiacka I.B., 2015, Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism, *International Journal of Molecular Sciences*, Volume 16: 25959-25981.
- Farkas, E., Luiten, P., Baric, F., 2007, Permanent, bilateral common carotis artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative disease, *Brain Research Reviews*, Volume 54:162-80.
- Fluri F., Schuhmann M.K., Kleinschnitz C., 2015, Animal Models of Ischemic Stroke and Their Application in Clinical Research, *Dove Press Journal*, Volume 9: 3445-3454.

- IBRC, 2013, Stroke modelling, TTC staining, immunohistochemistry, and neural tracing technique, *Workshop Module*, Surya University Campus, Serpong Tangerang.
- Khalilov R.A., Dzhafarova A.M., Dzhabrailova R.N., Emirbekov E.Z., 2014, Analysis of the Kinetic Characteristics of Lactate Dehydrogenase from the Rat Brain during Ischemia and Reperfusion, *Neurochemical Journal: Volume 8: 265-270 June 26, 2014 Number 4*.
- Lampl, Y., Paniri, Y., Eshel, Y., Sarova-Pinhas, I., 1989, Cerebrospinal Fluid Lactate Dehydrogenase Levels in Early Stroke and Transient Ischemic Attacks. *Stroke*. Volume 21: 854-857.
- Lovisa Holm, 2011, Focal Ischemic Reperfusion Stroke Model in Rats and the Role of Galanin, *Dissertations*, Clinical Chemistry faculty of Health Science, Linkoping University.
- Parakh N., Gupta H.L., Jain A., 2002, Evaluation of Enzymes in Serum and Cerebrospinal Fluid in Cases of Stroke, *Neurology India Publication of the Neurological Society of India*, Volume 50: 518-519.
- Prayson R.A., 2011, *Neuropathology*, Elsevier Saunders, Philadelphia PA.
- Quartu M., Poddighe L., Melis T., Serra M.P., Boi M., Isai S., Carta G., Murru E., Muredda L., Collu M., Banni S., 2017, Involvement of the Endocannabinoid System in the Physiological Response to Transient Common Carotid Artery Occlusion and Reperfusion, *Lipids in Health and Disease*, Volume 16: 1-11, Number 14.
- Raghavendra M., Trigunavat A., Singh R.K., Mitra S., Goel R.K., Achaarya S.B., 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, *Indian Journal of Experimental Biology*, Volume 45: 868-876 October, 2007 Number 10.
- Rambe, A., 2006, *Stroke: Sekilas Tentang Definisi, Penyebab, Efek dan Faktor Risiko*, Medan: Majalah Kedokteran Nusantara, Volume 10 (2): 195-198.
- Riyadina W., Rahajeng E., 2013, Determinan Penyakit Stroke, *Kesmas: National Public Health Journal*, Volume 7, Februari 2013, No.7.
- Sacco R.L., Kasner S.E., Broderick J.P., Caplan L.R., Connors J.J., Culebras A., Elkind M.S.V., George M.G., Hamdan A.D., Higashida R.T., Hoh, B.L., Janis L.S., Kase C.S., Kleindorfer D.O., Lee J.M., Moseley M.E., Peterson E.D., Turan T.N., Valderrama A.L., Vinters H.V., 2013, An Updated Definition of Stroke for the 21st Century, *American Heart Association Journals*, 2064-2089.
- Secades J.J., 2012, Probable Role of Citicoline in Stroke Rehabilitation: Review of the Literature, *Reveu Neurologique*, Volume 54: 173-179, February 1, 2012 Number 3.
- Setyopranoto I., 2011, Stroke: Gejala dan Penatalaksanaan, *Cermin Dunia Kedokteran* 185, Volume 38: 247-250 Mei-Juni 2011 No.4.
- Shcherbak N.S., Galagudza M.M., Ovchinnikov D.A., Kuz'menkov A.N., Yukina G.Yu., Barantsevich E.R., Tomson V.V., Shlyakhto E.V., 2013, Lactate Dehydrogenase Activity in the Cerebral Cortex and Hippocampus of

- Mongolian Gerbils in Ischemic and Reperfusion Injuries, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, Volume 43: 941-945 October, 2013 Number 8.
- Smith M., Citerio G., Kofke W.A., 2016, *Oxford Textbook of Neurocritical Care*, Oxford University Press, United Kingdom.
- Speetzen L.J., Endres M., Kunz A., 2013, Bilateral Common Carotid Artery Occlusion as an Adequate Preconditioning Stimulus to Induce Early Ischemic Tolerance to Focal Cerebral Ischemia, *Journal of Visualized Experiments*, Volume 75: 1-7.
- Syaifuddin, 2011, *Anatomi Tubuh Manusia untuk Mahasiswa Keperawatan*, Salemba Medika, Jakarta.
- Topic E., 2016, Differential Diagnosis and Prognostic Markers of Stroke, *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Volume 15 No 3.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Keterangan Lolos Kaji Etik


UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMITE ETIK PENELITIAN KEDOKTERAN DAN KESEHATAN
Sekretariat : Jl. Kaliurang Km. 14,5 YOGYAKARTA 55584
Telp. (0274) 898444 ext. 2060 Fax. (0274) 898444 ext. 2007; E-mail : ke.fkui@yahoo.co.id

Nomor : 13 /Ka.Kom.Et/70/KE/VII/2017

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran dan kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Islamic University of Indonesia, with regards of the protection of human rights and welfare in medical and health research, has carefully reviewed the research protocol entitled :

"Pengaruh Durasi Ligasi Transien Arteri Carotis Communis Bilateral terhadap Kadar Laktat Dehidrogenase pada Korteks Cerebri Tikus (*Rattus norvegicus*)."

Peneliti Utama : Sifa Anisa Yaoma
Principal Investigator

Nama Institusi : Program Studi Pendidikan Dokter FK UII
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
and approved the above-mentioned protocol.

Yogyakarta, 26 Juli 2017
Ketua
Chairman
Prof. Dr. Drs. Wiryatun Lestariyana, Apt



***Ethical Approval** berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan
****Peneliti berkewajiban**

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila :
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*

Lampiran 2. Analisis Data

Case Processing Summary

	Durasi Ligasi	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Kadar LDH	sham	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	5 menit	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	10 menit	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	15 menit	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%

Descriptives

	Durasi Ligasi	Statistic	Std. Error	
Kadar LDH	sham	Mean	1.311017	.1401273
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.950808
			Upper Bound	1.671225
		5% Trimmed Mean	1.312813	
		Median	1.287900	
		Variance	.118	
		Std. Deviation	.3432403	
		Minimum	.8703	
		Maximum	1.7194	
		Range	.8491	
		Interquartile Range	.7043	
		Skewness	.055	.845
		Kurtosis	-1.673	1.741
		Mean	1.155600	.1039176
5 menit		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.888471
			Upper Bound	1.422729
		5% Trimmed Mean	1.167033	
		Median	1.237250	
		Variance	.065	
		Std. Deviation	.2545452	
		Minimum	.7015	

		Maximum	1.4039	
		Range	.7024	
		Interquartile Range	.3866	
		Skewness	-1.349	.845
		Kurtosis	1.653	1.741
		Mean	1.486683	.1288561
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.155448
			Upper Bound	1.817919
		5% Trimmed Mean	1.486937	
		Median	1.475650	
		Variance	.100	
	10 menit	Std. Deviation	.3156318	
		Minimum	1.1554	
		Maximum	1.8134	
		Range	.6580	
		Interquartile Range	.6049	
		Skewness	.017	.845
		Kurtosis	-3.114	1.741
		Mean	1.268367	.1243555
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.948701
			Upper Bound	1.588033
		5% Trimmed Mean	1.260063	
		Median	1.220450	
		Variance	.093	
	15 menit	Std. Deviation	.3046075	
		Minimum	.9699	
		Maximum	1.7163	
		Range	.7464	
		Interquartile Range	.5126	
		Skewness	.476	.845
		Kurtosis	-1.631	1.741

Tests of Normality

	Durasi Ligasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar LDH	sham	.191	6	.200 [*]	.934	6	.612
	5 menit	.241	6	.200 [*]	.889	6	.312
	10 menit	.280	6	.153	.794	6	.052
	15 menit	.284	6	.140	.871	6	.232

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Kadar LDH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.680	3	20	.574

ANOVA

Kadar LDH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.340	3	.113	1.210	.332
Within Groups	1.875	20	.094		
Total	2.215	23			