

**PENGARUH PEMBERIAN ANESTESI KETAMINE XYLAZINE  
TERHADAP EKSPRESI P53 STRIATUM OTAK TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) PASCA *BILATERAL COMMON CAROTIS ARTERY  
OCCLUSION* (BCCAO)**

Karya Tulis Ilmiah

Untuk Memenuhi Sebagian Syarat  
Memperoleh Derajat Sarjana Kedokteran

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER**



Oleh :  
**Sahdellagustina**  
**15711127**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**  
**UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA**

**2018**

**THE EFFECT OF KETAMINE XYLAZINE ANESTHESIA ON P53  
EXPRESSION OF RAT (*Rattus norvegicus*) STRIATUM POST  
BILATERAL COMMON CAROTID ARTERIES OCCLUSION (BCCAO)**

Scientific Paper

A Part of Requirement to Obtain a Degree Bachelor of Medicine  
Islamic University of Indonesia



**Author**

**Sahdellagustina**

**15711127**

**FACULTY OF MEDICINE**

**ISLAMIC UNIVERSITY OF INDONESIA**

**2018**

KARYA TULIS ILMIAH

PENGARUH PEMBERIAN ANESTESI KETAMINE XYLAZINE  
TERHADAP EKSPRESI P53 STRIATUM OTAK TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) PASCA *BILATERAL COMMON CAROTIS ARTERY  
OCCLUSION* (BCCAO)

Disusun dan diajukan oleh :

**Sahdellagustina**

15711127

Telah Diseminarkan pada Tanggal 12 Desember 2018

Disetujui oleh :

**Pembimbing**



(dr. Ety Sari Handayani, M.Kes)

**Penguji**



(dr. Kuswati, M.Sc)

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



(dr. Umatul Khoiriyah, M. Med.Ed, Ph.D)

Disahkan Dekan



(dr. Linda Rosita, M.Kes., Sp.PK)

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>iv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>viii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN.....</b>	<b>ix</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>x</b>
<b>INTISARI.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Pertanyaan Penelitian.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Keaslian Penelitian.....	4
1.5. Manfaat Penelitian.....	6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>8</b>
2.1. Tinjauan Pustaka .....	8
2.1.1. Stroke .....	8
2.1.2. Iskemia Otak.....	12
2.1.3. Protein P53 .....	16
2.1.4. Model Stroke .....	17
2.1.5. Striatum Otak.....	20

2.1.6. Anestesi.....	21
2.2. Kerangka Teori.....	25
2.3. Kerangka Penelitian .....	25
2.4. Hipotesis.....	25
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>26</b>
3.1. Rancangan Penelitian.....	26
3.2 . Subyek Penelitian.....	26
3.3. Waktu dan Tempat Penelitian .....	27
3.4. Variabel Penelitian .....	27
3.5. Definisi Operasional .....	27
3.6. Alat dan Bahan Penelitian. ....	28
3.6.1. Alat Penelitian :.....	28
3.6.2. Bahan Penelitian : .....	28
3.7. Alur Penelitian.....	29
3.7.1. Persiapan Hewan Coba .....	29
3.7.2. Ligasi Arteri Carotis Comunis Bilateral.....	29
3.7.3. Perlakuan Pada Kelompok Shame Operated.....	29
3.7.4. Eutanasia dan Pengambilan Otak.....	30
3.7.5. Proses Sayatan Preparat untuk Pewarnaan IHC.....	30
3.7.6. Pewarnaan IHC.....	30
3.7.7. Proses Pengamatan Preparat.....	31
3.8. Analisis Data .....	32
3.9. Etika Penelitian.....	33
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>34</b>
4.1. Hasil Penelitian.....	34
4.1.1. Hasil Pengamatan pada Area Striatum .....	34

4.1.2. Hasil Ekspresi P53 Sel Neuron Striatum Pasca Anestesi .....	35
4.1.3. Analisis Data Ekspresi P53 Striatum Otak Tikus .....	37
4.2. Pembahasan .....	38
<b>BAB V KESIMPULAN .....</b>	<b>42</b>
5.1. Kesimpulan .....	42
5.2. Saran.....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>43</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>47</b>
Lampiran 1. Keterangan Lolos Kaji Etik .....	47
Lampiran 2. Analisis Data .....	48

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Klasifikasi Stroke Berdasarkan Proses Patologi.....	9
Gambar 2. Mekanisme Kematian Sel Neuronal pada Iskemia Otak.....	14
Gambar 3. Mekanisme dan Mediator yang Terlibat pada Kondisi Iskemik.....	15
Gambar 4. Peranan P53 Saat Terjadi Stroke .....	16
Gambar 5. Vaskularisasi Otak Tikus .....	18
Gambar 6. Skema Ligasi Arteri pada Rat Stroke Model .....	20
Gambar 7. Histologis Apoptosis Sel Neuron Striatum Otak Tikus Pasca Iskemik dengan Metode BCCAO .....	22
Gambar 8. <i>Allred Scoring</i> .....	32
Gambar 9. Hasil Pengamatan Sel Neuron Striatum .....	35

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Rerata Ekspresi P53 Sel Neuron Striatum Pasca Anestesi <i>Ketamine</i> .....	36
Tabel 2. Rerata Ekspresi P53 Sel Neuron Striatum Pasca Anestesi <i>Ketamine-Xylazine</i> .....	37
Tabel 3. Hasil Uji ANOVA Rerata Ekspresi P53 Sel Neuron Striatum .....	38



## **HALAMAN PERNYATAAN**

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Karya Tulis Ilmiah dengan judul “*Pengaruh Pemberian Anestesi Ketamine Xylazine Terhadap Ekspresi P53 Striatum Otak Tikus (Rattus norvegicus) Pasca Bilateral Common Carotis Artery Occlusion (BCCAO)*” ini disusun secara sadar tanpa adanya tindakan plagiasi, melainkan melakukan kutipan dari penelitian lain yang berhubungan dengan referensi tercantum dalam penulisan dan tidak terdapat Karya Tulis Ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar kesarjanaan di Universitas Islam Indonesia maupun di perguruan tinggi lain, serta belum ada peneliti atau penulis yang pernah menerbitkan Karya Tulis Ilmiah yang sama dengan judul penelitian ini.

Yogyakarta, 20 Desember 2018

Sahdellagustina

## KATA PENGANTAR

*Assalamua'laikum Wr. Wb.*

Alhamdulillah rabbil'alamin, puji syukur saya ucapkan kepada kehadiran Allah SWT yang dengan rahmat, hidayah, serta karunia-Nya Karya Tulis Ilmiah yang berjudul “*Pengaruh Pemberian Anestesi Ketamine Xylazine Terhadap Ekspresi P53 Striatum Otak Tikus (Rattus norvegicus) Pasca Bilateral Common Carotis Artery Occlusion (BCCAO)*” ini dapat diselesaikan dengan baik. Shalawat serta salam selalu tercurahkan pada nabi Muhammad Sholallahu'alaihi wasallaam yang telah menuntun seluruh umatnya dari zaman kegelapan menuju zaman yang terang benderang ini, serta senantiasa menjunjung tinggi nilai-nilai kehidupan Islam hingga saat ini dapat dinikmati seluruh umat manusia di penjuru dunia.

Karya Tulis Ilmiah ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat kelulusan dalam memperoleh gelar Sarjana Strata 1 (S1) pada Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Suka dan duka, kemudahan dan kesusahan, halangan maupun rintangan telah penulis hadapi dalam proses penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini. Dalam proses penyusunan proposal hingga selesainya penelitian ini tentu tidak terlepas dari bimbingan, arahan, bantuan, dan juga dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan kali ini penulis ingin memberikan apresiasi dan ucapan terimakasih yang tidak terkira ditujukan kepada :

1. Kedua orang tua tercinta, Bapak H. Sadikin, S.Sos dan Ibu Ahdawati yang telah bekerja keras memberikan seluruh pengorbanannya yang sangat luarbiasa dan tulus dalam memberikan pendidikan ketiga anaknya, dengan penuh sabar selalu memberikan semangat, motivasi serta do'a yang tiada henti setiap harinya untuk penulis sehingga Karya Tulis Ilmiah ini dapat terselesaikan dengan lancar dan tepat waktu.
2. Abangku tercinta, Izaharul Radzi, S.E., kakakku tercinta, Saliza Resti, S.Ip., yang secara tidak langsung memberi penulis sosok yang dapat dicontoh dan memotivasi penulis untuk bersemangat meraih prestasi selama menjalani

pendidikan kedokteran, serta selalu dapat memberikan nasihat kepada penulis baik dalam bidang pendidikan maupun dalam pelajaran kehidupan. Semoga kita menjadi pribadi yang semakin baik dan sukses selalu agar bisa membuat mama papa bangga dan bahagia.

3. Kakak iparku tercinta, Turina, S.E., serta kedua keponakan kecilku Rayi Keanu Elrafif dan Raira Hana Yasmin, yang selalu memberikan warna kehidupan sehingga penulis selalu rindu akan rumah dan keluarga yang jauh, yang kemudian membuat penulis bersemangat untuk kuliah agar dapat pulang ke rumah dengan disambut senyuman bangga keluarga.
4. Seluruh keluarga besar dari bapak dan ibu yang selalu mendukung serta memberikan motivasi perjuangan dalam menempuh pendidikan ini, terimakasih atas do'a dan harapan yang tidak pernah berhenti.
5. dr. Ety Sari Handayani, M.Kes., selaku pembimbing Karya Tulis Ilmiah ini yang selalu penuh sabar, keibuan, ikhlas, memberikan inspirasi, masukan, serta arahan-arahan positif kepada penulis sehingga Karya Tulis Ilmiah ini dapat selesai dengan cepat.
6. dr. Kuswati, M.Sc., selalu penguji Karya Tulis Ilmiah ini yang selalu sabar dan memberikan bimbingan serta masukan-masukan positif yang luar biasa dalam penyempurnaan penyusunan Karya Tulis Ilmiah.
7. dr. Esti Mahanani Sp.M., dan dr. Firandi Syahputra, Sp.JP., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu memberikan motivasi dan semangat selama menjalankan Studi Pendidikan Dokter di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.
8. dr. Linda Rosita, M.Kes, Sp.PK., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia yang selalu memberikan semangat dan dukungan moral kepada penulis.
9. dr. Umatul Khoiriyah, M.Med.Ed, Ph.D., selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.
10. Ardiansyah Maulana Mutaqin, selaku abang dan sahabat yang selalu sabar menghadapi, mengajari, menemani dan menasihati penulis dalam pendidikan, organisasi, hingga kehidupan. Terimakasih telah selalu ada dalam suka duka penulis, selalu menyemangati penulis saat terjatuh dan mengajarkan serta

menjadikan penulis menjadi pribadi yang lebih baik dan semakin dewasa. Semoga sehat selalu dan langkah menuju kesuksesan selalu dipermudah Allah SWT untukmu.

11. Muhammad Ivan Rimbadi, Afridhia Bidari dan Nurul Hidayah selaku partner perjuangan yang saling bagu-membahu dalam menjalani dan menyelesaikan penelitian ini hingga akhir serta bisa menyelesaikan Karya Tulis Ilmiah, semoga di masa depan kita sukses sesuai cita-cita yang diharapkan.
12. Sahabat dalam menghadapi tahun pertama perantauan dan penuh pergaulan kuliah, Maria Tamara Sihotang, S.Ked., dan Diah Oktaviani S.P., terimakasih telah mengajarkan penulis arti persahabatan tulus dan perjuangan meraih cita-cita. Semoga kita sukses walaupun di bidang yang berbeda.
13. Sahabat sejak tahun pertama perkuliahan, Elsa Churia Jannety, Bella Attirah, Maharani Puspita Dewi, Meilantri Rohma Suryani, Neysa Nur Prahutri, Natasya Naomi, dan Shafira Aliffiana. Terimakasih sudah mewarnai masa-masa perkuliahan penulis dengan penuh canda, tawa, duka, bahagia, mengajarkan penulis makna persahabatan dan kedewasaan. Terimakasih telah memberikan banyak inspirasi mengenai pelajaran hidup dan arti bersyukur. Semoga kita semua selalu diberikan kesehatan serta kelancaran dalam menyelesaikan studi dan meraih cita-cita.
14. Sahabat perjuangan, Rafifah Putri, Agustina Pramudianingtiyas, Pramudito Cahyo, Salsabila Ajeng, Muhammad Ivan Rimbadi, Afridhia Bidari, Hasnadya Fathin, Alfi Brilianti C.D., dan Hanif Ardiansyah, yang selalu memotivasi penulis untuk tidak malas belajar, mengajarkan untuk selalu berjuang melewati keterbatasan diri dan tidak pernah menyerah. Semoga kita selalu diberikan kesehatan serta kelancaran dalam menyelesaikan studi dan meraih cita-cita.
15. Sahabat seru dalam perkuliahan, Hendry Jati, Ari Fitriansyah, Pinandhita Annisa Wardhani, Olivia Candra Devi, Rr. Parasthity, Fatihah Arifah Rahmawati. Semoga segera menyusul dan diberikan kemudahan menggapai mimpi.
16. Senior TBMM Humerus FK UII sekaligus sebagai rumah kedua di perantauan, dr. Muhammad Bimo Pradito, dr. Rio Sahara, Naufal Arkhaputra S.Ked., Lukman Hanafi S.Ked, Yusa M. Thoriq S.Ked., dan Muh. Ikram Tahir S.Ked.,

yang selalu memberikan inspirasi dan petuah yang membuat semangat perkuliahan kembali.

17. Mas M. Zhafirrahman S.Ked., terimakasih atas segala nasihat, saran, selalu membantu memberikan inspirasi dan semangat baik selama masa pendidikan penulis di FK UII maupun di organisasi TBMM Humerus FK UII. Terimakasih atas peran besarnya dalam pembuatan Karya Tulis Ilmiah ini mulai dari mencari dosen pembimbing hingga pengolahan data dan saran dalam pembahasan. Semoga sukses selama koas dan tercapai cita-cita spesialisnya.
18. Teman seperjuangan divisi Internal Angkatan XII, Annisa Tristifany, Maftuhah Zahara, Raih Viguruh, dan Faris Ali Fauzi. Terimakasih sudah membantu penulis selama di Humerus. Semoga sukses koas dan diberikan kemudahan menggapai mimpi.
19. Adik-adikku tercinta di divisi Internal TBMM Humerus FK UII, Audina Dhiya, Farida Afifah, Jasmien Aisyah, Lilia Nur Rahmawati, Mirza Fikri Hilman, Widyo Utomo, Yudha Prasetyo, Yoan Yolanda, Joddy Malfica, Humaira, Fisabella Radite, Kresna, Putri Salisa, Salman Shalahuddin, Vania S. Ihwanah, yang memberikan warna kehidupan di rumah kedua yaitu TBMM Humerus FK UII.
20. Pengurus Harian TBMM Humerus 2018/2019, Alfianti Rhamadini, Wildan Jauhar, Kumara Dewi, Maryam Halimatul, Diajeng S. Kanae, dan Hana Nuraisa Basya, semoga cepat menyusul dan diberi kemudahan menggapai mimpi.
21. Sahabat seperantauan di Jogja, Yavad Vashogi, Deni Sedyatama, Naufal Abdilla, Randy Malfica, Luthfi Achmad, Pratama Hadi Nugraha, dan Gian Hidayat. Semoga selalu diberikan kemudahan dalam menggapai mimpi dan kesuksesan.
22. Sahabat Flighterku, Ayu Eka Putri, Surya Fachri, Faroh Nur Alfani, Verilla Sari Purba, Karina Sebayang, Fariz Ramadha, Farah Nurayya, Christine Dessy, dan Febiola Citra. Terimakasih sudah selalu menyempatkan diri untuk berkabar dan selalu ada dalam pertemanan yang terpisah jarak ini.
23. Sahabat-sahabat yang pernah menjadi sekelompok tutorial belajar, Sofia Yasmin Nabilla, Felix Geovani Hartono, Asyam Syafiq, Afrizal Adi Nugroho, Diva Avissa, dan Fathimah Azzahra (Tutorial tahun-1), Tina Hariyani, Afief Mulyawijaya, Anggita Pramesti, Nur Fadilla Aulia, Rosyid Mundzir (Tutorial tahun-2), Faiz Rahman, Anggita Pramesti, Ibrahim Dio, Lathifa Nafi'a, Susan

Indriani, Ulwan, Rifa Maulina (Tutorial tahun-3), Alfian Yudwi Laksono, Hisyam Ilham, Rozan Irfan, Yovita Oga Odedia, Zulfa Karomah, Khairunnisa (Tutorial tahun-4).

24. Keluarga dari satu bulan jadi selamanya, KKN 176, Cinda Ariwi, Nova Isva, Dhira Marda, Handika Irawan, Ryan Riyadi, Afi, Rhesa, semoga segera menyusul dan diberikan kemudahan menggapai mimpi.
25. Seluruh teman-teman sejawat AZATHRA FK UII angkatan 2015 yang selalu mendukung, menginspirasi dan memberi semangat, semoga angkatan kita dapat menyelesaikan studi dengan tepat waktu.
26. Ekologi, Simetri dan Praja yang selalu menjadi tempat istimewa untuk menuangkan ide dan pikiran dalam menyusun Karya Tulis Ilmiah ini.
27. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyusun Karya Tulis Ilmiah ini.

Semoga Karya Tulis Ilmiah ini dapat bermanfaat bagi dunia kesehatan pada khususnya, dan bagi siapapun yang membacanya sehingga menjadi bahan pembelajaran dan wawasan bagi kita semua. Dan semoga seluruh pihak yang telah turut serta berperan dan membantu dalam penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini mendapat balasan yang berlipat-lipar dari Allah SWT, *Allahumma Amiin*.

Akhir kata, penulis mohon maaf yang sebesar-besarnya apabila masih terdapat banyak kesalahan dalam penyusunan Karya Tulis Ilmiah ini, untuk itu penulis memohon kritik, masukan dan saran yang membangun untuk perbaikan Karya Tulis Ilmiah ini. Kekurangan milik penulis dan kesempurnaan hanya milik Allah SWT semata. Terimakasih. *Wassalamualaikum Wr. Wb.*

Yogyakarta, 20 Desember 2018

Sahdellagustina

**PENGARUH PEMBERIAN ANESTESI KETAMINE XYLAZINE  
TERHADAP EKSPRESI P53 STRIATUM OTAK TIKUS (*Rattus  
norvegicus*) PASCA BILATERAL COMMON CAROTIS ARTERY  
OCCLUSION (BCCAO)**

**INTISARI**

**Latar Belakang:** Stroke disebabkan karena perdarahan atau obstruksi (iskemia) pada otak. Kondisi iskemia pada hewan coba bisa dilakukan dengan teknik BCCAO (*Bilateral Common Carotis Artery Occlusion*). Kondisi ini memicu terjadinya apoptosis yang ditandai dengan peningkatan kadar protein proapoptosis yaitu P53. Anestesi *ketamine-xylazine* bersifat neuroprotektif sehingga dapat mengurangi kerusakan neuron striatum otak tikus pasca serangan iskemia global yang diinduksi stroke.

**Tujuan Penelitian:** Mengetahui apakah ada pengaruh anestesi *ketamine xylazine* terhadap ekspresi p53 striatum otak tikus pasca *Bilateral Carotid Commune Occlusion*.

**Metode Penelitian:** Merupakan penelitian eksperimental dengan *Post-test Only Control Group Design*. Penelitian ini menggunakan bahan biologi tersimpan berupa blok paraffin jaringan otak tikus yang terdiri dari empat kelompok perlakuan. Kelompok pertama adalah kelompok *shame operated* dengan anestesi *ketamine-xylazine*, kelompok kedua adalah kelompok *shame operated* dengan anestesi *ketamine*, kelompok ketiga adalah kelompok BCCAO dengan anestesi *ketamine-xylazine* dan kelompok keempat adalah kelompok BCCAO dengan anestesi *ketamine*. Ekspresi P53 dilihat dengan pengecatan IHC (imunohistokimia). Analisis data dilakukan dengan uji *One Way Anova*.

**Hasil:** Terdapat perbedaan tidak bermakna ekspresi sel neuron striatum antara kelompok dengan anestesi *ketamine xylazine* dan *ketamine* baik dengan *shame operated* maupun operasi BCCAO. Kelompok BCCAO dengan anestesi *ketamine xylazine* menunjukkan rerata ekspresi P53 terbanyak sebesar 4.945 dan kelompok *shame operated* dengan anestesi *ketamine* menunjukkan rerata ekspresi P53 paling sedikit sebesar 4.735.

**Kesimpulan:** Tidak terdapat pengaruh signifikan ( $p>0.05$ ) antara pemberian anestesi *ketamine* maupun *ketamine-xylazine* terhadap ekspresi P53 pada neuron striatum otak tikus *Rattus norvegicus* pasca BCCAO (*Billateral Common Carotid Artery Occlusion*).

**Kata Kunci:** *ketamine, ketamine-xylazine, P53 expression, BCCAO.*

**THE EFFECT OF KETAMINE XYLAZINE ANESTHESIA ON P53  
EXPRESSION OF RAT (*Rattus norvegicus*) STRIATUM POST BILATERAL  
COMMON CAROTID ARTERIES OCCLUSION (BCCAO)**

**ABSTRACT**

**Background:** Stroke can be caused by hemorrhage or obstruction (ischemia) on the brain. Ischemic condition on animal trial can be done by Bilateral Common Carotid Arteries Occlusion (BCCAO) technique. Ischemic condition trigger apoptosis marked by elevation of p53, a proapoptotic protein. Ketamine-xylazine anesthesia have a neuroprotective properties that can reduce damage of striatum neuron in rat brain post global ischemic attack induced by stroke.

**Objective:** The aim of this study is to determine the effect of ketamine xylazine anesthesia on p53 expression of rat (*Rattus norvegicus*) striatum post bilateral common carotid arteries ligation.

**Methods:** This experimental study is using post test only control group design methods, using stored biological material in the form of paraffin block of rat brain tissue that consist of four different intervention groups. The first group is sham operated with ketamine xylazine anesthesia, the second group is sham operated with ketamine only anesthesia, the third group is BCCAO with ketamine xylazine anesthesia, and the fourth group is BCCAO with ketamine only anesthesia. P53 expression can be seen through immunohistochemistry (IHC) coloring. One Way Anova test is used for data analysis.

**Results:** There is difference on striatum neuron cell p53 expression between both sham operated and BCCAO group with ketamine xylazine and ketamine only anesthesia, proven by One Way ANOVA test with result of  $P=0,269$  ( $p>0,05$ ). On BCCAO group with ketamine xylazine anesthesia, they showed the most average expression of p53 from all group is 4,945. Meanwhile, sham operated group with ketamine only anesthesia showed the least average expression of p53 from all group, which is 4,735.

**Conclusion:** There are no significant difference between ketamine only anesthesia intervention and ketamine xylazine anesthesia intervention on p53 expression on striatum neuron rat (*Rattus norvegicus*) brain post bilateral common carotid arteries occlusion (BCCAO).

**Keywords:** ketamine, ketamine xylazine, p53 expression, BCCAO



# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Stroke merupakan salah satu penyakit serebrovaskular dengan prevalensi yang semakin meningkat tiap tahunnya dan merupakan penyebab kematian serta kecacatan tertinggi di Indonesia yang berdampak secara sosioekonomi. Pada tahun 2007 prevalensi stroke di Indonesia sebanyak 8,3% dan meningkat pada tahun 2013 menjadi 12,1% (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2013). Pada tahun 2011 di Amerika setiap 40 detik terdapat kematian akibat stroke dan jumlahnya meningkat tiap tahunnya (AHA, 2015). Sebanyak 87% kasus stroke merupakan stroke iskemia, dimana terdapat hambatan pada aliran darah otak (CDC, 2017).

Iskemik merupakan suatu peristiwa nekrotik dan apoptosis dengan tanda kegagalan bioenergetik, asidotoksisitas, eksitotoksisitas, stres oksidatif dan inflamasi yang disebabkan oleh oksigen jaringan tidak adekuat. Kerusakan sel-sel otak pasca iskemik terjadi melalui dua cara, pertama penurunan ketersediaan oksigen yang menyebabkan penurunan produksi energi dan mengurangi kelangsungan hidup sel-sel otak, kedua akibat penurunan ketersediaan oksigen yang menyebabkan produksi radikal bebas dan aktivasi mediator-mediator inflamasi. Ketersediaan oksigen yang tidak adekuat menyebabkan produksi ATP menurun, asidosis intraseluler, dan depolarisasi neuron dan glia sehingga terjadi hipereksitabilitas reseptor NMDA dan AMPA yang kemudian meningkatkan kadar kalsium intraseluler dan pelepasan glutamat meningkat mengakibatkan iskemik semakin luas. Kematian sel akibat iskemik diregulasi oleh protein tumor supresor p53. Peningkatan protein p53 menunjukkan banyaknya apoptosis yang terjadi pada stroke iskemik (Filichia *et al.*, 2015).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Li, *et al.* (2011) ditemukan bahwa striatum merupakan organ yang sensitif terhadap iskemik otak sehingga kematian sel saraf striatum pasca iskemik tidak membutuhkan waktu yang lama. Striatum

merupakan struktur dalam ganglia basalis yang berperan sebagai modulator utama dengan mengatur impuls motorik dari otak yang disinkronisasi dengan fungsi striatum lainnya berupa memori, pembuat keputusan, perhatian atau fokus dan rencana dalam aksi motorik (Harsay *et al.*, 2011). Apoptosis sel striatum mengakibatkan modulator impuls gerakan motorik berkurang sehingga menimbulkan gejala utama berupa gangguan motorik yang biasanya muncul pada penderita stroke (Li *et al.*, 2010).

Untuk menggambarkan kondisi iskemia pada otak tikus, model *transient* BCCAO merupakan model yang unggul karena mortalitas pada hewan coba yang lebih rendah. Teknik BCCAO menginduksi kematian sel saraf dan mikroinfark pada otak sehingga dapat digunakan untuk meneliti mekanisme obat neuroprotektan dengan cara menghitung jumlah sel saraf yang mengalami apoptosis. Teknik ini dilakukan dengan mengikat arteri karotis komunis bilateral tikus selama beberapa menit, kemudian dilanjutkan dengan pelepasan ikatan tersebut (*reperfusion*) (Jing *et al.*, 2015). BCCAO memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan teknik induksi iskemik lainnya. Jika dibandingkan dengan teknik sham, hasil MRI BCCAO menunjukkan adanya degenerasi parsial dan komplit pada saraf sebelum dan sesudah kiasma optikum serta peningkatan jumlah microglia. Penurunan jumlah jaringan ikat dan vakuolisasi sel ditemukan lebih sedikit pada teknik BCCAO dibandingkan dengan teknik sham dan prognosis perbaikan sel saraf pada BCCAO lebih baik dari teknik sham sehingga angka mortalitas hewan coba rendah (Soria *et al.*, 2013).

Tindakan oklusi didahului dengan penyuntikan anestesi pada tikus model BCCAO. Anestesi merupakan obat yang berperan sebagai analgesik untuk menurunkan rasa nyeri pada tindakan operatif. Ketamin merupakan jenis anestesi yang umum digunakan pada hewan coba yang berfungsi sebagai analgesik dan anestetik. Ketamin dengan dosis yang tidak tepat dapat menimbulkan efek samping berupa stimulasi saraf simpatis, takikardi, peningkatan tegangan otot, tekanan intraokular dan bila dosis yang digunakan berlebihan dapat menimbulkan pelepasan mediator *neurotoxic* yang menyebabkan apoptosis dan kerusakan saraf.

Selain perubahan pada fisiologis, Ketamin dapat menimbulkan perubahan psikologis berupa mimpi, halusinasi dan efek psikotomimetik berkepanjangan, selain itu ketamin sangat berpotensi menimbulkan ketergantungan obat (Kurdi, Theerth and Deva, 2014). Ketamin merupakan *NMDA receptor blocker* selektif yang bekerja dengan cara menekan influks ion kalsium untuk menghindari cedera otak. Namun, hingga saat ini *NMDA-receptor blocker* masih gagal dalam tahap uji klinis karena efek samping neurologis yang ditimbulkan (Zhang *et al.*, 2007).

Anestesi selain ketamine yang biasa digunakan pada percobaan bedah dengan hewan coba yaitu *xylazine* dan *isoflurene*. Diketahui bahwa *xylazine hydrochloride* memiliki sifat analgetik, sedatif, dan *muscle relaxant*, dan menurunkan tekanan darah sehingga dapat menekan efek samping dari ketamine (Gonca *et al.*, 2015). Efek sedatif yang ditimbulkan *xylazine* disebabkan oleh depresi sistem saraf pusat dan pusat termoregulator sehingga mereduksi frekuensi respirasi dan suhu rektal. *Xylazine* bekerja dengan menginhibisi sistem saraf simpatis sehingga dapat menurunkan frekuensi respirasi dan denyut jantung (Kurdi, Theerth and Deva, 2014). Keuntungan sifat *xylazine* tersebut diduga dapat digunakan sebagai anestesi bersifat neuroprotektif dan baik digunakan sebagai anestesi lokal (Yadav, Thorat and Bedarkar, 2008).

Pada penelitian ini menggunakan ketamin dan *xylazine* untuk mengetahui efek neuroprotektif dari kombinasi *ketamine-xylazine*. Tingkat kerusakan sel saraf pasca iskemik yang ditandai dengan ekspresi p53 pada *ketamine* lebih berat jika dibandingkan dengan kombinasi *ketamine-xylazine*. Penambahan *xylazine* pada kombinasi *ketamin-xylazine* dapat menekan kerja jantung sehingga dapat menurunkan frekuensi respirasi dan denyut jantung. Selain itu, kombinasi *ketamine-xylazine* menimbulkan hasil reaksi yang lebih cepat dibandingkan dengan hanya dilakukan pemberian anestesi *ketamine*. Peran *xylazine* dalam kombinasi *ketamine-xylazine* dapat menurunkan absorpsi ketamin sehingga waktu eliminasi *ketamine* terjadi lebih lama dan efek anestesi bertahan lebih lama (Kurdi, Theerth and Deva, 2014). Sebagai indikator efek neuroprotektif *ketamine* dan *xylazine*, kerusakan sel pasca iskemik dapat ditunjukkan dengan ekspresi p53.

P53 terbentuk akibat adanya aktivasi oleh ROS yang dikeluarkan mitokondria sel yang rusak pasca iskemik sehingga memicu kerusakan DNA dan apoptosis sel (Petegnief and Planas, 2013).

Berdasarkan telaah ilmiah yang telah dilakukan, hingga saat ini belum ada penelitian mengenai pengaruh pemberian anestesi kombinasi ketamine-xylazine terhadap ekspresi p53 striatum otak tikus pasca BCCAO. Selain itu terdapat beberapa perbedaan pendapat dalam jurnal mengenai efek anestesi dari *ketamine* dan *ketamine-xylazine*. Menurut Ferro(2016), ketamin bersifat neuroprotektif dengan cara menghancurkan radikal bebas pada saraf dopaminergik, sedangkan menurut Lei (2001), *ketamine* dengan dosis 50mg/kgBB tidak menimbulkan efek neuroprotektif yang signifikan. Urgensi dari penelitian ini dilihat dari pentingnya peran organ striatum otak dalam proses terbentuknya gerakan motorik yang tidak bisa dipisahkan dari kelancaran aktivitas sehari-hari manusia, sehingga dibutuhkan penemuan obat anestesi yang bersifat neuroprotektan agar tingkat kematian sel saraf striatum pada kasus stroke iskemik dapat direduksi dilihat dari ekspresi P53 sebagai parameter spesifik kematian neuron otak.

## **1.2. Perumusan Masalah**

Atas dasar latar belakang di atas maka perumusan masalah yang diajukan adalah sebagai berikut: Apakah ada pengaruh pemberian anestesi *ketamine xylazine* terhadap ekspresi p53 striatum otak tikus pasca BCCAO?

## **1.3. Tujuan Penelitian**

Berdasarkan latar belakang dan pertanyaan penelitian maka tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut: Mengetahui apakah ada pengaruh anestesi *ketamine xylazine* terhadap ekspresi p53 striatum otak tikus pasca *Bilateral Carotid Commune Occlusion*

#### 1.4. Keaslian Penelitian

Berdasarkan studi pustaka di *Pubmed*, *Cochrane*, *Google*, maka penelitian dengan judul Pengaruh Anestesi *Ketamine Xylazine* Terhadap Ekspresi p53 Striatum Otak Tikus Pasca *Bilateral Carotid Commune Occlusion* adalah penelitian baru. Adapun terdapat beberapa penelitian hampir serupa, yaitu :

1. Lei, *et al* (2010) dengan penelitiannya “*Effects of Ketamine and Ketamine-xylazine Anesthesia on Cerebral Blood Flow in Rat Observed Using Arterial Spin Tagging Perfusion Imaging*”.
2. Choi, *et al* (2010) dengan penelitiannya “*Differential neurochemical responses in the rat striatum with isoflurane or ketamine/xylazine anesthesia: in vivo proton MRS study at 16.4 T*”.
3. Engelhard, *et al* (2003) dengan penelitiannya “*The Effect of the  $\alpha_2$ -Agonist Dexmedetomidine and the N-Methyl-D-Aspartate Antagonist S(+)-Ketamine on the Expression of Apoptosis-Regulating Proteins After Incomplete Cerebral Ischemia and Reperfusion in Rats*”.
4. Ferro *et al* (2006) dengan penelitiannya “*Neuroprotective effect of ketamine/xylazine on two rat models of Parkinson’s disease*”.

Tabel 1. Keaslian Penelitian

N	Penulis	Persamaan	Perbedaan	Hasil
1	Lei, <i>et al.</i> (2001)	Menggunakan Anestesi Ketamin-Xylazine	Teknik perhitungan menggunakan MR arterial spin tagging perfusion imaging	Ketamin-xylazine mereduksi cerebral blood flow (CBF) lebih signifikan dari ketamin
2	Choi, <i>et al.</i> (2010)	Menggunakan anestesi Ketamin-Xylazine dan lokasi	Teknik perhitungan menggunakan proton magnetic resonance spectroscopy (H-MRS)	Konsentrasi metabolit di striatum otak Ketamin-xylazine lebih rendah dari anestesi isoflurane

---

		perhitungan di striatum otak tikus		
3	Engelhard, <i>et al.</i> (2003)	Menggunakan teknik perhitungan ekspresi protein proapoptosis	Teknik induksi yang digunakan UCAO dan anestesi alpha 2-agonist dexmedetomidine dan N-Methyl-D-aspartate antagonist S(+)-ketamine	Ekspresi protein proapoptosis lebih banyak diekspresikan dengan menggunakan anestesi dexmedetomidine
4	Ferro, <i>et al.</i> (2006)	Menggunakan anestesi ketamine-xylazine	Teknik perhitungan menggunakan hitung sel tyrosine hydroxylase-immunoactive dan teknik induksi MPTP dan OHDA. Percobaan terkhusus pada penyakit parkinson	Ketamine-xylazine memperlambat degenerasi saraf

---

### 1.5. Manfaat Penelitian

Adapun dengan dilakukannya penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi beberapa kalangan, antara lain :

#### 1. Pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi

Penelitian ini berguna untuk mengetahui pengaruh obat anestesi ketamine xylazine terhadap ekspresi p53 pada striatum otak untuk pengembangan anestesi neuroprotektan pada tikus teknik stroke model yang efektif, efisien, murah dan akurat. Penelitian ini akan menambah khasanah ilmu kedokteran mengenai anestesi yang tepat untuk menghindari degrassi saraf dan bersifat neuroprotektif yang dapat diaplikasikan untuk menurunkan angka kecatatan yang diakibatkan stroke.

## 2. Manfaat bagi peneliti

Penelitian ini akan meningkatkan kemampuan peneliti melakukan teknik BCCAO dengan pewarnaan IHC, dan dapat digunakan sebagai standar perlakuan untuk penelitian selanjutnya. Hasil karya tulis penelitian ini juga digunakan sebagai syarat kelulusan pendidikan sarjana kedokteran peneliti.

## 3. Manfaat bagi masyarakat

Masyarakat akan mendapatkan manfaat dari penelitian ini secara tidak langsung. Adanya penelitian ini dapat digunakan untuk mengurangi angka kejadian stroke iskemik yang terjadi di Indonesia melalui peningkatan kualitas penelitian mengenai anestesi yang bersifat neuroprotektif.

## 4. Manfaat bagi institusi

Manfaat bagi FK UII adalah meningkatkan nilai akreditasi FK UII melalui publikasi hasil penelitian ini.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Tinjauan Pustaka**

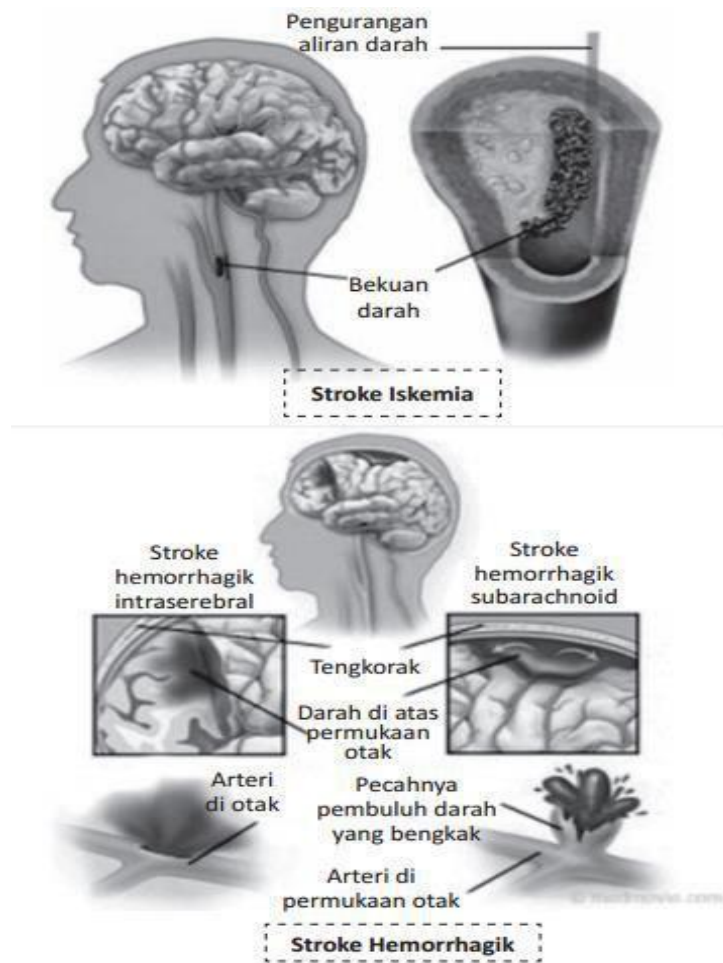
##### **2.1.1. Stroke**

###### **2.1.1.1. Definisi**

Menurut Setyopranoto (2014), stroke adalah gangguan fungsional otak akibat gangguan pada aliran darah otak yang bersifat fokal maupun global secara akut dalam periode lebih dari 24 jam (kecuali ada intervensi bedah atau meninggal) dan dapat menyebabkan kematian. Stroke bersifat fokal jika stroke tidak disertai penurunan tekanan darah, peningkatan intrakranial signifikan dan spesifik mengenai neuron yang kurang perfusi darah, sementara stroke bersifat global mengenai daerah yang spesifik, misalnya hanya area hippocampus, thalamus atau yang lainnya dimana daerah tersebut bisa jadi tidak ada kaitannya dengan distribusi spesifik dari vaskular (Mozaffarian *et al.*, 2016).

*European Stroke Initiative Executive* (EUSI) (2003) menyebutkan bahwa terdapat dua jenis stroke berdasarkan proses patologi yaitu stroke iskemik dan stroke hemoragik yang mencakup perdarahan intraserebral dan subaraknoid. Stroke iskemik merupakan stroke yang disebabkan adanya obstruksi arterial yang memperludarahi otak sehingga terjadi penurunan pasokan energi dan oksigen pada jaringan sel-sel otak di daerah perdarahan dari arteri yang mengalami obstruksi. Stroke hemoragik merupakan kondisi ketika pembuluh darah di otak pecah sehingga menyebabkan perdarahan di dalam jaringan otak atau di sekitar permukaan jaringan otak dekat lokasi perdarahan (Holm, 2011).





Gambar 1. Klasifikasi Stroke Proses Patologi (Yueniwati, 2014)

### 2.1.1.2. Etiologi

Penyebab utama sebagian besar kasus stroke terjadi akibat stroke iskemik. Prevalensi stroke iskemik sebesar 87 % pasien, sisanya merupakan stroke hemoragik tipe intraserebral 10 % pasien dan tipe subdural 3 % pasien (Chauhan and Debette, 2016). Sebagian besar kasus stroke iskemik disebabkan oklusi oleh thrombus, embolus, atau tromboembolus yang menyebabkan blokade aliran darah di arteri atau karena benda asing yang dibentuk jauh dari otak, biasanya dari jantung atau dari percabangan arteri carotis (Holm, 2011). Oklusi pembuluh darah menyebabkan terjadinya penurunan aliran darah ke otak dari angka normal 58 ml/100 gram jaringan otak per menit menjadi dibawah 18 ml/100 gram sehingga

menimbulkan ketidaknormalan aliran listrik neuron sampai kematian sel. Penyebab stroke hemoragik dibedakan berdasarkan tipe perdarahannya yang murni karena kelainan vaskular, bukan terjadi akibat trauma. Penyebab utama stroke hemoragik tipe intraserebral karena adanya hipertensi tidak terkontrol sedangkan penyebab stroke hemoragik tipe subdural dikarenakan pecahnya aneurisma pada percabangan arteri besar otak (Setyopranoto, 2012).

### **2.1.1.3. Faktor Risiko**

Pembuluh darah, darah dan jantung merupakan komponen faktor risiko yang saling berkaitan. Menurut Setyopranoto (2012), faktor risiko stroke dapat dibagi menjadi 2, yaitu faktor risiko yang dapat di kendalikan dan faktor risiko yang tidak dapat di kendalikan. Faktor risiko yang dapat di kendalikan diantaranya adalah riwayat hipertensi, penyakit jantung, endokarditis, stenosis mitralis, infark jantung, atrial fibrilasi, diabetes melitus, merokok dan konsumsi alkohol. Hipertensi dan umur merupakan faktor risiko utama pada penyakit serebrovaskular. Risiko perdarahan otak pada pasien hipertensi 3,9 kali lebih tinggi dari pasien tanpa hipertensi dan pada pasien dengan aneurisma subarachnoid, risiko stroke meningkat 2,8 kali. Diabetes mellitus yang dilengkapi dengan dislipidemia, hipertensi dan obesitas merupakan faktor risiko yang bersifat aterogenik pada pasien diabetes tipe 2 sehingga menjadi penyebab aterotrombotik. Penyakit jantung seperti atrial fibrilasi, atrial flutter dan infark jantung merupakan penyebab kedua terjadinya penyakit serebrovaskular dan berperan 27 % pada kematian pasien stroke akut (Mozaffarian *et al.*, 2016).

Faktor risiko yang tidak dapat dikendalikan yaitu umur, jenis kelamin, ras dan etnis, herediter, berat bayi lahir rendah, riwayat stroke keluarga, dan geografis. Pada tahun 2006 di Spanyol ditemukan 93 % pasien stroke berumur lebih dari 64 tahun. Selain itu diketahui bahwa angka kejadian penyakit serebrovaskular pada pria lebih tinggi dibandingkan pada wanita. Penyakit aterosklerotik intrakranial pada ras Asia lebih sering terjadi dibandingkan ras lain. Riwayat stroke keluarga meningkatkan risiko kejadian serebrovaskular akut yang lebih sering terjadi dibandingkan dengan faktor risiko vaskular lainnya

(Mozaffarian *et al.*, 2016). Faktor risiko ini berhubungan dengan faktor herediter yang terjadi karena kelainan letak gen pada kromosom yang menimbulkan faktor risiko lainnya, contohnya adalah hipetensi pada lokus ALDH2 dan HDAC9, penyakit arteri koroner di lokus ABO, chr9p21, HDAC9, atrial fibrilasi di lokus PITX2 dan ZFH3, formasi plak di arteri carotis di lokus MMP12 dan neuroinflamasi di lokus TSPAN2 (Chauhan and Debette, 2016).

#### **2.1.1.4. Efek Stroke**

Defisit neurologis merupakan efek dari stroke yang akan menimbulkan gejala pada beberapa kemampuan pasien sehingga pasien mengalami gangguan aktivitas. Defisit neurologis yang ditimbulkan dapat berupa akut fokal dan atau non fokal (Setyopranto, 2012). Tanda defisit neurologis fokal dapat dibagi menjadi enam pembagian gejala, yaitu gejala motorik, sensorik, visual, gangguan bicara(bahasa), kognitif(perilaku) dan vestibular. Gejala motorik dapat berupa kelemahan otot pada salah satu sisi tubuh, baik seluruhnya maupun sebagian (hemiparesis dan monoparesis), ketidakseimbangan, kesulitan menelan dan kelemahan bilateral simultan. Gangguan sensorik diekspresikan berupa perubahan perubahan rasa atau sensasi pada sebagian atau seluruh tubuh. Gejala visual biasanya ditemukan adanya keluhan penglihatan ganda, perubahan lapang pandang, kebutaan bilateral, gangguan penglihatan pada satu atau kedua mata. Gangguan bahasa dapat berupa kesulitan memahami atau mengekspresikan bahasa lisan, kesulitan menghitung dan membaca (disleksia). Disorientasi visual, spasial dan persepsi merupakan gejala penurunan kognitif (Ferdinand and Roffe, 2016). Sedangkan gejala penurunan vestibular ditandai dengan keluhan disorientasi tubuh terhadap ruangan atau lingkungan sekitar saat beraktivitas, gangguan keseimbangan tubuh, dan koordinasi gerakan tubuh. Tanda defisit neurologis non fokal dapat terjadi namun tidak dapat dijadikan tanda pasti yang khas yaitu sensasi kepala menjadi ringan, perubahan tingkat kesadaran, inkontinensia urin atau feses, kebingungan serta tinnitus (Sitorus, 2014).

### 2.1.2. Iskemia Otak

Stroke adalah penyakit vaskular pada otak yang menyebabkan penurunan fungsi otak baik secara sementara maupun permanen. Stroke terbagi menjadi dua yaitu stroke iskemik dan stroke hemoragik. Penurunan darah ke otak mendasari mekanisme stroke iskemik. Jika terjadi penurunan darah pada satu bagian otak maka disebut dengan fokal iskemik. Penurunan aliran darah ke semua bagian otak disebut dengan global iskemik (Yang *et al.*, 2006).

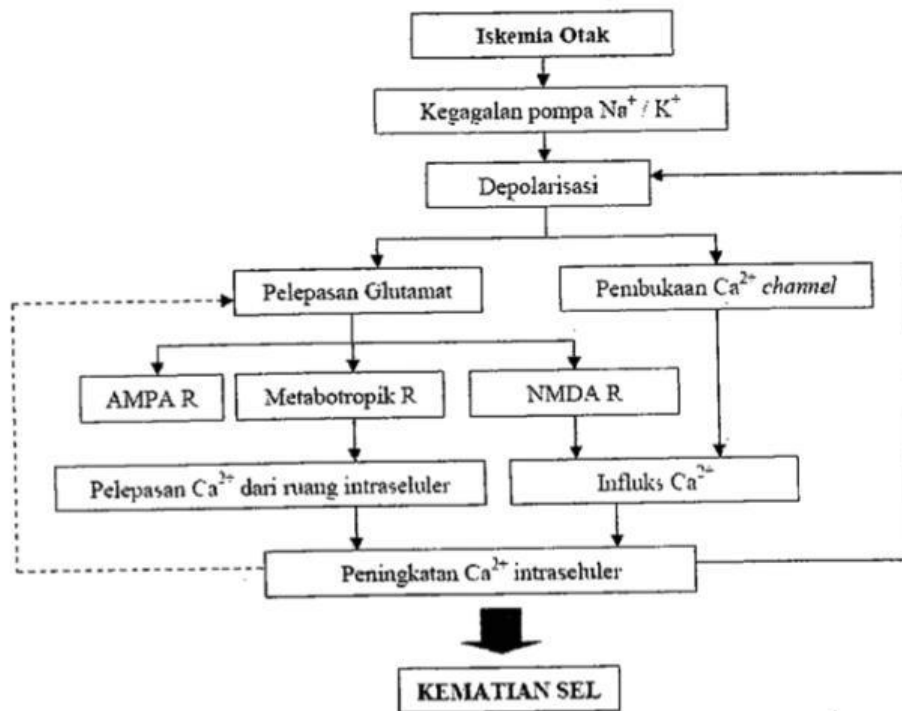
Aterosklerotrombosis merupakan prinsip dasar terjadinya stroke iskemik. Secara histopatologis akan ditemukan tanda-tanda degeneratif pada tunika muskularis dan proliferasi tunika intima. Terjadinya aterosklerotrombosis dimulai dengan adanya ruptur plak arteri, aktivasi kaskade pembekuan dan platelet, pembentukan trombus hingga aliran darah otak mendadak berkurang (Setyopranoto, 2012).

Daerah perubahan neurologik yang ditimbulkan stroke iskemik bergantung pada sirkulasi darah di daerah iskemia yang dibedakan atas bagian inti (*core*) dan penumbra. Jaringan otak yang paling parah mengalami iskemik disebut *ischemic core*. Daerah penumbra adalah area di sekitar *ischemic core* dimana penurunan darah pada daerah tersebut ringan sampai sedang (hipoksia). Jaringan penumbra terletak diantara jaringan dengan perfusi normal dan jaringan non perfusi. Hal ini disebabkan adanya pembuluh darah kolateral dari jaringan sekitarnya yang tidak mengalami iskemik sehingga daerah penumbra akan tetap hidup sampai mendapat aliran darah secara normal kembali. Gangguan fungsional otak sebagai dampak iskemik tergantung pada derajat iskemik dan durasi penurunan aliran darah (Setyopranoto, 2012; Majid, 2014).

Kerusakan sel-sel otak sebagai dampak iskemik terjadi melalui dua cara, pertama penurunan ketersediaan oksigen menyebabkan penurunan produksi energi dan mengurangi kelangsungan hidup sel-sel otak, yang kedua akibat penurunan ketersediaan oksigen menyebabkan produksi radikal bebas, aktivasi mediator-mediator inflamasi dan berakhir melalui mekanisme apoptosis. Sesaat setelah otak mengalami iskemik maka akan terjadi perubahan molekuler pada neuron. Hal ini diinisiasi oleh penurunan energi seluler akibat terganggunya

proses fosforilasi oksidatif, penurunan pH jaringan, penurunan produksi ATP, dan kegagalan pompa  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase. Kegagalan pompa  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase dan pompa ion lainnya menimbulkan gangguan homeostasis ion dan dapat menginduksi mekanisme kematian sel di area *ischemic core* (Setyopranoto,2012).

Iskemik otak dapat menimbulkan depolarisasi neuron dan glia melalui proses masuknya natrium, klorida, kalsium dan air ke sitoplasma. Sebaliknya, kalium keluar meninggalkan sel dan terjadi peningkatan pelepasan glutamat ekstraseluler menyebabkan perubahan muatan ekstraseluler yang meningkatkan aktivasi reseptor glutamat. Glutamat merupakan neurotransmitter eksitatorik yang dapat mempengaruhi sel yang terletak di ekstraseluler dan memiliki reseptor di membran sel. Reseptor glutamat terdiri dari dua tipe, yaitu ionotropik dan metabotropik. Reseptor ionotropik berhubungan dengan cations channels, terdiri dari N-metyl-D-aspartate(NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), dan kainat. Kegagalan energi dan perubahan muatan ion, serta peningkatan glutamat sehingga terjadi toksisitas oksidatif glutamat dan hipereksitabilitas reseptor NMDA dan AMPA menyebabkan peningkatan kadar kalsium intraseluler yang berujung pada kematian sel melalui apoptosis maupun nekrosis (Setyopranoto, 2012; Majid, 2014). Gambar 2 menjelaskan mekanisme kematian sel neuronal pada iskemia otak.



Gambar 2. Mekanisme Kematian Sel Neuronal pada Iskemia Otak  
(Setyopranoto, 2012)

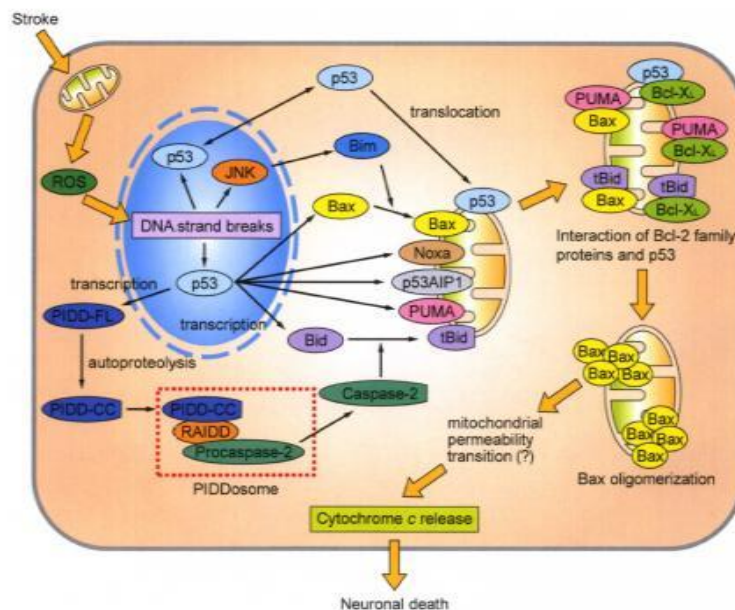
Hipereksibilitas menyebabkan fenomena depolarisasi di sekitar area iskemik. Peningkatan kalsium yang disertai dengan asidosis dan depolarisasi area sekitar iskemik akan menginisiasi kerusakan sel, diikuti oleh proses inflamasi dan aktivasi apoptosis. Selama iskemik berlangsung, khususnya saat terjadi reperfusi, akan dihasilkan radikal bebas. Terdapat perbedaan proses pembentukan radikal bebas yang ditentukan secara bertahap. Proses awal pembentukan dimulai dengan produksi ROS oleh metabolisme asam arakidonat dan aktivitas neuronal NO (*Nitric Oxide synthase* (nNOS)). Kemudian pada fase intermediat, ROS dihasilkan karena adanya infiltrasi netrofil di area iskemik. Akhirnya, ROS diproduksi melalui sintesis dan aktivasi NO *synthase enzymes* (iNOS) dan cyclooxygenase2 (COX2) (Setyopranoto,2012).

Kondisi iskemik mencetuskan aktivasi dan ekspresi gen. Hal ini disebabkan karena adanya kerusakan neuron, proses seluler dalam neuron dan mekanisme perbaikan jaringan. Kematian sel akibat iskemik melalui dua



### 2.1.3. Protein p53

Iskemik pada otak dapat menginduksi apoptosis yang diaktivasi dengan peningkatan faktor transkripsi p53 didahului dengan adanya kerusakan sel. Setelah adanya kerusakan sel, mitokondria membentuk ROS yang kemudian menuju ke inti sel dan mengaktivasi p53. P53 di dalam inti sel menginduksi protein pro-apoptotic seperti Bax, Noxa, *p53AIP1*, PUMA, dan Bid. Berbagai senyawa tersebut akan beraksi dalam mitokondria. Translokasi p53 ke dalam membran mitokondria akan mengaktivasi *mitochondria-dependent apoptotic pathway*. Kompleks interaksi p53 dan *pro-apoptotic Bcl-2 family members bax* (*Bcl-2 associated x protein*) dan *bak* (*Bcl-2 associated killer*), menyebabkan transisi permeabilitas mitokondria yang menginduksi pelepasan *cytochrome c*. *Cytochrome c* berikatan dengan procaspase-9 dan Apaf-1 (*apoptotic protein activating-activating factor-1*) membentuk apoptosom dan mengaktivasi caspase 9 kemudian caspase 3 yang membelah enzim perbaikan nDNA yaitu PARP (poly ADP-ribose polymerase) sehingga memicu kerusakan DNA dan apoptosis. Gambar 4 menjelaskan peranan p53 saat terjadi stroke dan mekanisme apoptosis melalui jalur intrinsik (Petegnief and Planas, 2013; Niizuma *et al.*, 2009).



Gambar 4. Peranan p53 saat terjadi stroke (Niizuma *et al.*, 2009)



#### **2.1.4. Model Stroke**

##### **a. Anatomi Sistem Vaskular Otak Tikus**

Tikus mempunyai susunan anatomi vaskularisasi otak yang mirip dengan manusia. Pengenalan dan pemahaman yang bagus mengenai vaskularisasi otak tikus sangat dibutuhkan dalam penelitian dengan penerapan model stroke (Wang-fischer, 2009). Inti vaskularisasi otak tikus berasal dari 3 percabangan arteri utama yaitu arteri carotis interna, arteri basilaris dan arteri cerebialis posterior (Casals *et al.*, 2011).

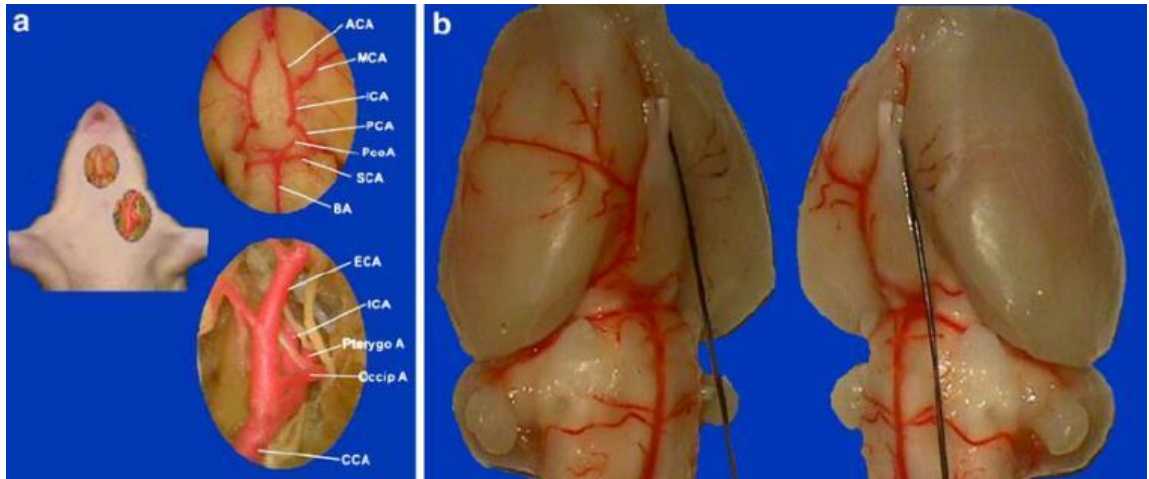
Aorta merupakan arteri besar yang keluar dari jantung kemudian melengkung membentuk arcus aorta yang bercabang menjadi 3 percabangan arteri yaitu arteri brachiocephalica, arteri carotis communis sinistra dan arteri subclavia sinistra. Arteri brachiocephalica bercabang menjadi arteri brachialis, arteri subclavia dextra dan arteri carotis communis dextra (Wang-fischer, 2009).buku

Arteri carotis interna yang berasal dari percabangan arteri carotis communis merupakan arteri yang mengarah ke craniomedial. Setelah memasuki cranium, arteri carotis interna akan bercabang menjadi arteri communican posterior, arteri hypothalamic, arteri choroidal, arteri cerebral anterior dan arteri cerebral media (Wang-fischer, 2009).

Arteri basilaris merupakan arteri hasil anastomosis dari arteri vertebralis di region setinggi pons yang bercabang menjadi arteri cerebral posterior. Arteri vertebralis merupakan percabangan dari arteri subclavia yang menyilang ke atas melewati plexus brachialis (Wang-fischer, 2009).

Struktur penting penunjang kebutuhan otak dengan segala kemungkinan penghambat vaskular adalah sirkulus willisi. Struktur ini merupakan gabungan dari arteri cerebral anterior dan media yang merupakan cabang dari arteri carotis interna dan arteri cerebral posterior hasil cabang dari arteri basilaris. Diantara struktur tersebut ada arteri yang saling menghubungkan, yaitu arteri communican

anterior dan arteri communican posterior (Watson, Paxinos, & Puelles, 2012).  
buku



Gambar 5. Vaskularisasi otak tikus. ACA : Arteri Carotis Anterior. ICA : Arteri Carotis Interna. CCA : Arteri Carotis Communis. ECA : Carotis Comunis Eksterna. MCA : Arteri Cerebral Media. PCA : Arteri Cerebral Posterior. PcoA : Arteri Communican Posterior. SCA : Arteri Cerebellum Superior. BA : Arteri BASilaris. Occip A : Arteri Occipitalis. Pterigo A. Arteri Pterigopalatina (Yang, Liu, Shety, & Foster, 2006).

## b. Model Stroke

*Rat stroke model* adalah penggunaan hewan coba tikus sebagai model stroke. Studi mengenai stroke paling ideal dilakukan adalah dengan subjek tikus. Menurut Bacigaluppi, et al., (2010), penelitian stroke mempunyai dua tujuan besar yaitu meneliti faktor risiko penyebab stroke dan meneliti patofisiologi stroke sehingga harapannya bisa dijadikan rujukan terapis untuk mencegah atau mengobati stroke.

Berdasarkan data epidemiologi, stroke iskemik lebih banyak disebabkan oleh sumbatan atau oklusi arteri serebral media. Terdapat 2 jenis oklusi yaitu oklusi permanen dan oklusi *transient*. Oklusi arteri serebral media otak secara permanen dapat menilai kondisi iskemik otak dengan daerah yang cukup luas yaitu di cortex striatum/globus palidus, nucleus thalamicus dan hippocampus.

Model oklusi secara *transient* menimbulkan kerusakan area cortex dan striatum (IBRC, 2013).

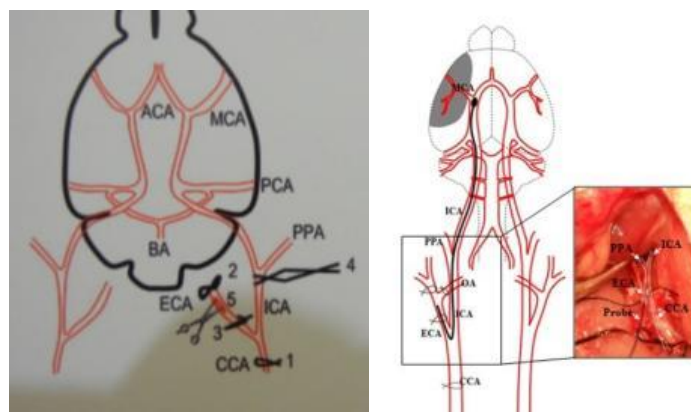
Prinsip model stroke ini dibagi menjadi dua, yaitu iskemik global (IG) maupun iskemik fokal (IF). Metode IG merupakan pengoklusian pembuluh darah besar yang memperdarahi otak yaitu ligasi pada kedua arteri carotis comunis dextra dan sinistra sehingga terjadi hipoperfusi otak secara masif, sedangkan metode IF merupakan pengoklusian satu dari pembuluh darah besar yang memperdarahi otak pada bagian tertentu dengan berbagai tingkatan kerusakan contohnya ligasi pada arteri cerebral media (Shetty, Liu, & Rutledge, 2006).

Metode IG (iskemik global) mempunyai dua teknik utama pengerjaan yaitu '*four vessel occlusion method*' (4VO) dan '*two vessel occlusion method*' (2VO). Teknik 4VO bisa di kerjakan dengan cara mengoklusi arteri carotis comunis secara transient dan 2 arteri vertebralis secara permanen sehingga di dapatkan iskemik pada dua bagian besar otak yaitu batang otak dan kedua hemisfer otak. Teknik 2VO dapat dilakukan dengan cara mengoklusi arteri carotis comunis secara transient contohnya pada teknik '*Bilateral common carotid arteries occlusion*' (BCCAO). Pada metode dengan sifat transient, kerusakan yang di timbulkan beragam tergantung dari durasi iskemik dan reperfusi otak (Bacigaluppi, Comi, & Hermann, 2010).

Induksi iskemik otak secara unilateral menggunakan modifikasi teknik Koizomi. Sebelum ke tahap operasi, tikus hendaknya di adaptasikan dengan lingkungan selama beberapa hari dan latihan pengukuran motorik tikus. Anestesi pra operasi di lakukan dengan pemberian ketamin dan xylazin. Tikus diletakkan di *platform* steril dan jaga suhu rectal tikus pada temperatur  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  (van der Worp *et al.*, 2015).

Operasi dimulai terlebih dahulu dengan desinfeksi permukaan anterior leher tikus kemudian dilanjutkan insisi bagian medial leher anterior secara vertikal, eksplorasi leher anterior dan dilakukan irisan pada glandula submandibular. Proses operasi dilanjutkan dengan insisi musculus

sternocleidomastoideus untuk menampakkan arteri carotis comunis dan kemudian dilakukan ligasi pada kedua arteri tersebut (Gambar 6). Lama pengerjaan operasi tidak boleh lebih dari 3 menit. Setelah operasi tempatkan tikus pada kandang transparan dengan suhu ruangan (25°C) dan diamati. Perilaku dan kognitif pada model stroke oklusi permanen dan transien dapat diamati melalui uji *spatial memory, contralateral motor function and coordination* (van der Worp *et al.*, 2015).



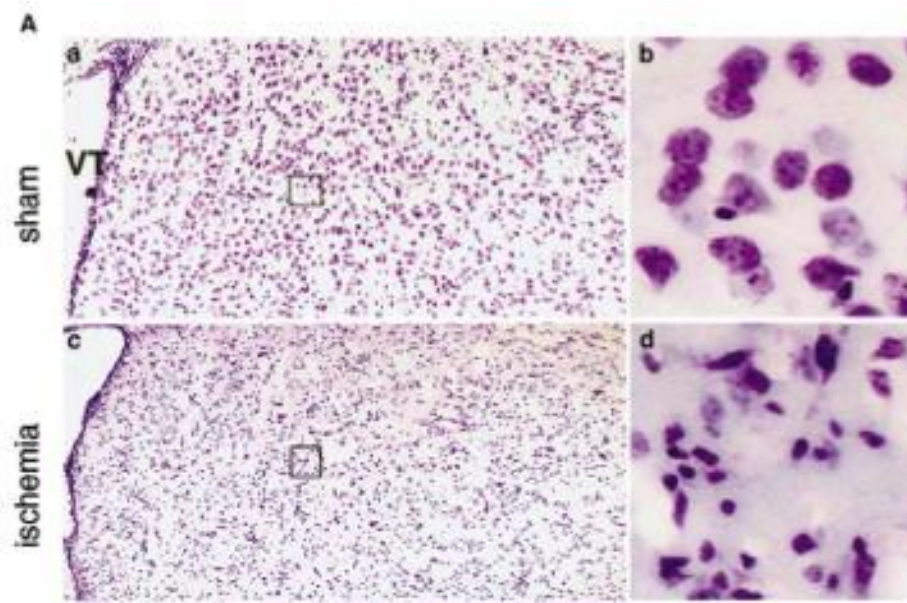
Gambar 6. Skema ligasi arteri pada *rat stroke model*. (1) Ligasi di arteri carotis comunis, (2 dan 3) ligasi arteri karotis eksterna, (4) ligasi arteri carotis interna (IBRC, 2013)

### 2.1.5. Striatum Otak

Ganglia basalis merupakan struktur otak bagian dari telenchepalon yang berperan dalam fungsi kognitif dan kecerdasan emosi (Rothwell, 2011). Ganglia basalis terdiri dari beberapa nuclei yaitu corpus striatum (Nucleus caudatus dan Putamen), Globus pallidus, Nucleus subthalmicus, dan Substantia nigra di Mesencephalon. Ganglia basalis merupakan struktur yang tidak bisa dipisahkan dari kompleks lengkung umpan balik kortikal dalam keluaran motorik dengan jalur dari cortex ke ganglia basalis dan diteruskan ke thalamus kemudian kembali ke cortex. Fungsi utama ganglia basalis adalah memodulasi dengan cara memperkuat atau menghambat aktivitas motorik mulai dari kekuatan, arah, hingga rentang gerakan. Adanya kerusakan pada ganglia basalis dapat menimbulkan

gangguan gerakan motorik (distonia) berupa hiperkinetik atau hipokinetik berat (Sobotta, 2012; Rothwell, 2011).

Aktivitas neural di sejumlah area otak memiliki sistem modulasi yang dapat membantu sinkronisasi antara keinginan otak dengan gerakan motorik yang diharapkan. Striatum merupakan struktur utama dalam ganglia basalis yang berperan sebagai modulator dengan mengatur kanal penerima kelistrikan saraf utama dalam otak (Rothwell, 2011). Striatum diibaratkan sebagai mesin yang mempelajari informasi penting yang secara otomatis mensinkronisasi seluruh informasi yang pernah ada di dalam memori otak dan mewujudkan gerakan berupa output yang sesuai dengan yang diinginkan oleh otak. Kerja striatum tidak lepas dari peran neuron dopamin yang memiliki kemampuan selektif tinggi dalam pemutusan impuls apabila impuls yang terbentuk di saraf striatum tidak sesuai dengan perintah otak sehingga terbentuk sistem belajar “*actor-critic*”. Striatum berperan sebagai “*actor*” yang yang diperintahkan oleh “*critic*” atau dopamine agar terbentuk suatu gerakan yang sesuai dengan perintah otak (ROTHWELL, 2011). Mekanisme kerja striatum menggambarkan fungsi utamanya sebagai modulator dalam mengatur impuls motorik dari otak yang disinkronisasi dengan fungsi striatum lainnya berupa memori, pembuat keputusan, perhatian atau fokus dan rencana dalam aksi motorik (Harsay *et al.*, 2011). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Li, et al. (2011) ditemukan bahwa striatum merupakan organ yang sensitif terhadap iskemik otak transient, sehingga saraf striatum mati dalam 25-30 menit pasca iskemik.



Gambar 7. Gambaran histologis apoptosis sel neuron striatum otak tikus pasca iskemik dengan metode BCCAO (Bilateral Carotid Commune Occlusion) (Tajiri, 2004)

## 2.1.6. Anestesi

### 2.1.6.1. Ketamine

Ketamin merupakan anestesi yang umum digunakan pada hewan coba. Ketamin dengan dosis yang tepat diketahui memiliki fungsi sebagai analgesik sekaligus anestetik. Pemberian ketamin menimbulkan efek analgesik yang kuat dan diikuti dengan efek hipnotik yang superfisial. Selain itu Ketamin dapat menstimulasi saraf simpatis dengan cara penggabungan ketamin dan  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-agonis sehingga menurunkan efek simpatomimetik yang menyebabkan hemodinamik stabil dan mereduksi kebutuhan pasien terhadap obat vasoaktif (Kurdi, Theerth and Deva, 2014). Selain itu, ketamin memiliki efek kehilangan kesadaran dan penurunan respon rangsangan dari luar yang cepat sehingga dapat digolongkan kedalam obat disosiatif anestetikum. Ketamin adalah obat anestesi yang sering digunakan dalam operasi. Ketamin merupakan *NMDA(N-metil-D-aspartat) receptor blocker* selektif. Ketamin bekerja dengan menghambat efek membran dan eksitasi neurotransmitter asam glutamat pada

reseptor NMDA sehingga menekan influks ion kalsium untuk menghindari cedera otak (Zhang *et al.*, 2007).

Hingga saat ini *NMDA-receptor blocker* masih gagal dalam tahap uji klinis karena efek samping neurologis yang ditimbulkan. Efek samping yang ditimbulkan ketamin berupa stimulasi saraf simpatis, takikardi, peningkatan tegangan otot dan tekanan intraokular bila dosis yang digunakan berlebihan dapat menimbulkan pelepasan mediator *neurotoxic* yang menyebabkan apoptosis dan kerusakan saraf. Peningkatan tegangan otot dapat menyebabkan terjadinya kejang dan depresi ringan pada saluran pernapasan. Efek samping dari fungsi ketamin sebagai obat kataleptik berupa dilatasi pupil, salivasi, lakrimasi, dan gerakan spontan pada tungkai. Kelainan psikologis yang dapat ditimbulkan ketamin dapat berupa mimpi, halusinasi dan efek psikotomimetik berkepanjangan, selain itu ketamin sangat berpotensi menimbulkan ketergantungan obat (Kurdi *et al.*, 2014).

#### **2.1.6.2. Xylazine**

*Xylazine hydrochloride* memiliki sifat analgetik, sedatif, *muscle relaxant*, dan menurunkan tekanan darah sehingga dapat menekan efek samping dari ketamine (Gonca *et al.*, 2015). Efek sedatif yang ditimbulkan xylazine disebabkan oleh depresi sistem saraf pusat dan pusat termoregulator sehingga mereduksi frekuensi respirasi dan suhu rektal. Xylazine bekerja pada reseptor presinaptik dan postsinaptik sistem saraf pusat, serta sebagai agonis adrenergik pada sistem saraf perifer sehingga dapat menghambat sistem saraf simpatis yang memberikan efek penurunan frekuensi respirasi dan denyut jantung (Kurdi, 2014). Keuntungan sifat xylazine tersebut diduga dapat digunakan sebagai anestesi bersifat neuroprotektif dan baik digunakan sebagai anestesi lokal (Yadav, 2008).

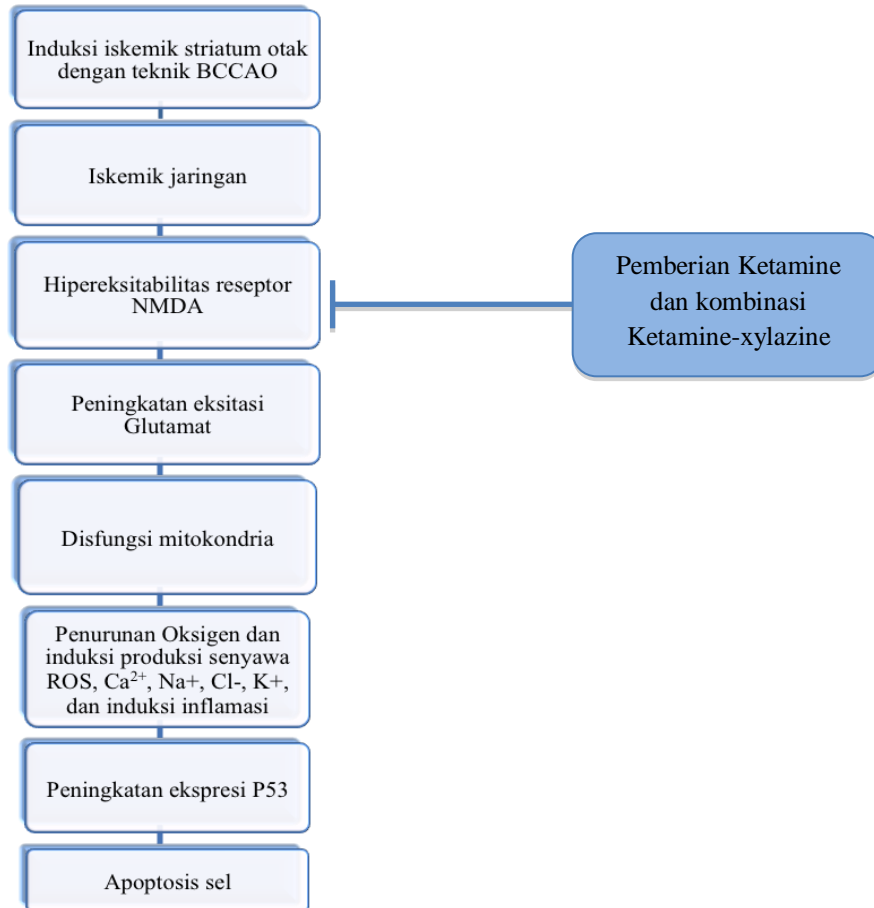
#### **2.1.6.3. Kombinasi Ketamine-xylazine**

Beberapa penelitian yang menggunakan hewan coba menggunakan kombinasi ketamine dengan *alpha-2 agonist* yaitu *xylazine* untuk mengurangi efek samping ketamin. *Xylazine hydrochloride* dapat berfungsi sebagai analgesik, sedatif, *muscle relaxant* dan menurunkan tekanan darah sehingga dapat menekan

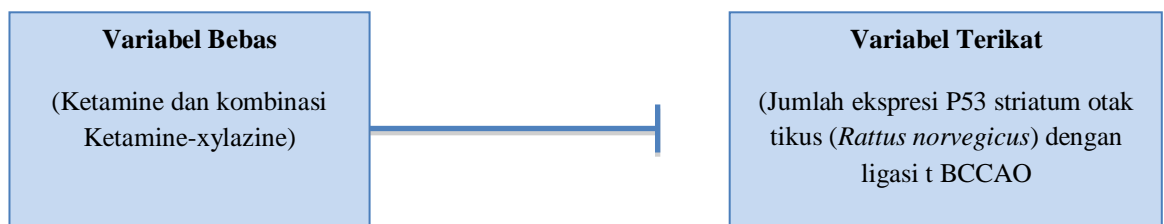
efek samping dari ketamine (Gonca et al., 2015). Efek sedatif yang ditimbulkan xylazine disebabkan oleh depresi sistem saraf pusat dan pusat termoregulator sehingga mereduksi frekuensi respirasi dan suhu rektal (Yadav, Thorat and Bedarkar, 2008). Penggunaan xylazine pada kombinasi ketamin-xylazine dapat menekan metabolisme di seluruh sel tubuh dan kerja jantung sehingga dapat menurunkan frekuensi respirasi dan denyut jantung sehingga dapat digunakan sebagai anestesi bersifat neuroprotektif. Selain itu, kombinasi ketamine-xylazine menimbulkan hasil reaksi yang lebih cepat dibandingkan dengan hanya dilakukan pemberian anestesi ketamine. Peran xylazine dalam kombinasi ketamine-xylazine dapat menurunkan absorpsi ketamin sehingga waktu eliminasi ketamin terjadi lebih lama sehingga efek anestesi bertahan lebih lama jika dibandingkan dengan pemberian anestesi ketamin saja (Kurdi, 2014).



## 2.2. Kerangka Teori



## 2.3. Kerangka Penelitian



## 2.4 Hipotesis

Pemberian kombinasi ketamine-xylazine pada tikus yang diinduksi BCCAO (*Bilateral Carotid Commune Occlusion*) dapat menurunkan ekspresi P53 pada striatum otak tikus.

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental kuasi dengan menggunakan rancangan penelitian *post test control group design*.

### 3.2 Subyek Penelitian

Subyek penelitian yaitu tikus jantan dewasa (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang dikembangkan oleh FK UII yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

Kriteria inklusi subyek penelitian ini yaitu tikus jantan yang sehat dan tidak cacat, berumur 3 bulan dengan berat badan 103-142 gram. Tikus dikatakan sehat ditentukan berdasarkan keadaan fisik tikus yaitu kondisi bulu yang bersih, tidak basah atau lengket, tikus aktif bergerak, makan, minum dan tidur sesuai siklus hidupnya. Kriteria eksklusi subyek penelitian yaitu tikus yang sakit dan mati selama perjalanan penelitian.

Penentuan besar sampel dengan teknik *simple random sampling* dan perhitungannya menggunakan metode *resource equation* (Charan and Kantharia, 2013).

$$E = \text{Total Jumlah Hewan} - \text{Total Jumlah Kelompok}$$

$$10-20 = \text{Total Jumlah Hewan} - 4$$

$$\begin{aligned} \text{Total Jumlah Hewan} &= (10-20) + 4 \\ &= 14-24/4 \text{ kelompok} \\ &= 3-6 \text{ ekor/kelompok} \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, untuk mengetahui jumlah sampel tikus yang dipakai dengan mempertimbangkan angka kejadian kematian tikus, maka jumlah sampel dihitung lagi dengan *corrected sample size* sebagai berikut,

$$\begin{aligned} \text{Corrected sample size} &= \text{Sample size} / [1-(\% \text{kematian}/100)] \\ &= 3-6 \text{ ekor} / [1-(20\%/100)] \end{aligned}$$

= 4-7 ekor tikus.

Jumlah tikus yang digunakan pada penelitian ini adalah 4-7 ekor tikus, dengan jumlah perlakuan sebanyak 4 kali maka total tikus adalah 16-28 ekor tikus. Adapun gambaran kelompok adalah sebagai berikut :

1. Kelompok 1 merupakan kelompok *shame operated* 2 (operasi yang sama tanpa ligasi arteri karotis komunis bilateral) dengan anestesi ketamine - xylazine
2. Kelompok 2 merupakan kelompok *shame operated* 1 (operasi yang sama tanpa ligasi arteri karotis komunis bilateral) dengan anestesi ketamine
3. Kelompok 3 adalah kelompok perlakuan 1 (*rat stroke model*) dengan anestesi ketamine-xylazine
4. Kelompok 4 adalah kelompok perlakuan 2 (*rat stroke model*) dengan anestesi ketamine

### **3.3 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini akan berlangsung selama enam bulan dengan tempat penelitian di Laboratorium Fisiologi FK UII dan Laboratorium PA FK UGM.

### **3.4 Variabel Penelitian**

#### **3.4.1 Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi protein p53 pada otak tikus (*Rattus norvegicus*) dengan ligasi tBCCAO

#### **3.4.2 Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ketamine dan kombinasi ketamine-xylazine.

### **3.5 Definisi Operasional**

1. Ligasi arteri carotis comunis bilateral adalah pengikatan arteri carotis communis bilateral

2. Ketamin-xylazine. Ketamine dosis 75 mg/kg (Alfamine 10%, Alfasan Int., Woerden, Netherlands), dan xylazine dosis 8 mg/kg (Alfazyne 2%, Alfasan Int., Woerden, Netherlands) i.m.
3. Jumlah neuron striatum adalah jumlah semi kuantitatif neuron pada preparat area striatum dengan pewarnaan IHC P53 dan diamati menggunakan mikroskop CSX21 secara histologis.
4. Ekspresi P53 adalah indikator kerusakan sel pasca iskemik yang dapat meginduksi apoptosis sel

### **3.6 Alat dan Bahan Penelitian**

#### **3.6.1 Alat penelitian**

- a. kandang untuk pengelompokan tikus
- b. alat bedah minor
- c. benang silk untuk ligasi
- d. sterilisator ruangan dan peralatan
- e. perfusi trankardial
- f. alat trimming otak

#### **3.6.2 Bahan penelitian**

- a. Tikus jantan (*rattus norvegicus*) galur Wistar berumur 3 bulan didapatkan dari FK UII
- b. Ketamine
- c. Ketamine-xylazine
- d. bahan perfusi transkardial
- b. Obat analgetik
- c. Bahan desinfeksi
- d. Pakan
- e. Akuades

## **3.7 Alur Penelitian**

### **3.7.1 Persiapan hewan coba**

Pada hari ke-1 sampai hari ke-7, hewan coba adaptasi di kandang. Satu kandang diisi oleh 1 tikus. Suhu dalam kandang diatur pada suhu kamar. Pencahayaan dalam kandang diatur dengan siklus terang gelap selama 12 jam. Siklus terang dimulai pukul 06.00 WIB dan siklus gelap dimulai pukul 18.00 WIB. Pelet diberikan setiap hari pada pagi hari pukul 06.00 WIB. Air minum diberikan secara *ad libitum*.

### **3.7.2 Ligasi arteri carotis comunis bilateral**

Ligasi arteri dilakukan pada hari ke-8. Tahapan ligasi adalah sebagai berikut :

- a. Tahap anestesi. Selama operasi tikus dianestesi menggunakan ketamin dosis 80-100 mg/kgBB im. Tikus diletakkan di platform steril dan jaga suhu rectal tikus pada temperatur  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- b. Tahap desinfeksi. Tahap ini bertujuan untuk mencegah infeksi. Desinfeksi menggunakan alkohol dan larutan betadin di permukaan leher anterior tikus.
- c. Tahap insisi. Insisi dilakukan secara vertikal pada bagian median leher anterior.
- d. Tahap eksplorasi arteri karotis komunis. Eksplorasi leher anterior tanpa memotong glandula submandibularis dan nervus phrenicus.
- e. Tahap Ligasi. Setelah arteri karotis komunis tampak maka dilakukan ligasi arteri karotis komunis dengan menggunakan benang silk secara permanen.
- f. Setelah ligasi selesai maka diberikan terapi analgetik yaitu bupivacain 0,25% dosis 0,1 mL lokal, frekuensi pemberian satu kali/hari (analgetik yang dianjurkan untuk *rat stroke model*). Bekas insisi dijahit kembali dengan menggunakan benang silk. Daerah disekitar insisi didisinfeksi menggunakan betadin.

### **3.7.3 Perlakuan Pada Kelompok Shame Operated**

Pada hari ke- 8, Kelompok shame mendapatkan perlakuan operasi yang sama dengan kelompok kontrol dan perlakuan tanpa dilakukan ligasi arteri karotis komunis bilateral.

#### **3.7.4 Eutanasia dan Pengambilan otak**

Eutanasia dilakukan pada hari ke-11 dengan teknik perfusi transkardial hingga darah telur keluar sampai habis dengan sebelumnya tikus dianestesi menggunakan ketamin dosis 80-100 mg/kgBB im. Setelah tikus masuk dalam fase anestesi dalam maka dilakukan insisi linea mediana pada dinding abdomen, dilanjutkan insisi sepanjang linea axilaris sampai dinding thoraks terbuka dan jantung terlihat. Ventrikel kiri jantung diinsisi kemudian kanula dimasukkan sampai mencapai aorta ascenden. Kanula difiksasi dengan penjepit arteri. Dilakukan insisi atrium kanan untuk mengeluarkan darah. Cairan perfusi saline dialirkan melalui kanula. Kemudian dilakukan jepitan pada aorta descendens agar otak mendapatkan perfusi sepenuhnya. Perfusi saline dilanjutkan sampai darah yang keluar melalui atrium kanan tampak jernih dan arteri mamaria interna di sekitar sternum tampak putih karena terisi cairan jernih. Setelah perfusi transkardial sempurna maka dilakukan dekapitasi, kemudian jaringan otak diambil dan dilakukan pewarnaan IHC.

#### **3.7.5 Pembuatan Preparat untuk Pewarnaan IHC**

Jaringan otak pasca dekapitasi kemudian dilakukan blok parafin bagian striatum dan disayat setebal 5  $\mu\text{m}$  dengan menggunakan *rotary microtome*. Diambil satu sayatan, kemudian dilakukan pewarnaan IHC (imunohistokimia) dengan *antibody anti-p53*.

#### **3.7.6 Pewarnaan IHC**

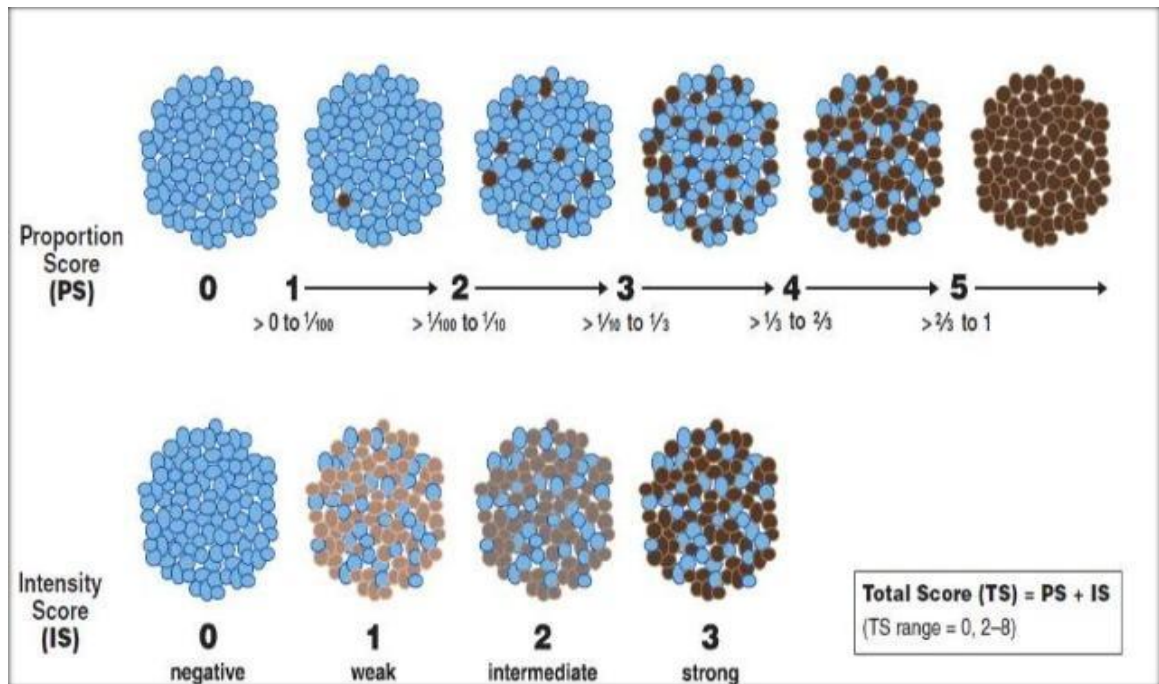
Pewarnaan IHC dimulai dengan deparafinisasi otak tikus menggunakan *xylol* dan alkohol hingga konsentrasi menurun. Jaringan selanjutnya diinkubasi dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% dalam 10% methanol selama 20 menit, kemudian dicuci dengan menggunakan akuades tiga kali dan PBS tiga kali. Selanjutnya dilakukan *antigen retrieval* dengan *buffer* sitrat pH 6 di dalam *microwave*. Irisan dipanaskan selama 10 menit dalam temperatur tinggi ( $100^\circ\text{C}$ ) kemudian dilanjutkan dengan temperatur sedang-rendah selama 20 menit dan terakhir didinginkan. Setelah dingin, irisan dicuci kembali sebanyak tiga kali menggunakan PBS.

Irisan kemudian diblocking dengan protein *background snipper* dalam waktu 10 menit lalu ditetesi antibodi (Ab) primer caspase-3 aktif dan diinkubasi selama satu malam dengan suhu 4°C kemudian dicuci kembali sebanyak tiga kali dengan PBS. Setelah itu irisan diinkubasi dengan Trekki Universal Link selama 10 menit dan dicuci kembali dengan PBS sebanyak tiga kali yang selanjutnya dilakukan inkubasi dengan *horseradish peroxidase conjugated Streptavidin* (kompleks SA-HRP) selama 10 menit dan dicuci kembali dalam PBS sebanyak tiga kali.

Deteksi sel p53 dilakukan dengan 3,3'-diaminobenzidin (1:100) selama lima menit. Jaringan selanjutnya dicuci sebanyak lima kali menggunakan akuades dan dilanjutkan *counterstained* dengan *hematoxylin meyers* selama satu menit, kemudian cuci dengan air mengalir selama dua menit. Selanjutnya dilakukan dehidrasi menggunakan etanol bertingkat yaitu 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100% masing-masing selama satu menit. Kemudian dibersihkan dengan *xylene* dan *dicoverslip* dengan *canada balsam*.

### **3.7.7 Proses Pengamatan Preparat**

Preparat histologis diamati menggunakan mikroskop cahaya *Olympus CX21* dengan kamera *optilab* yang terhubung pada komputer dengan perbesaran 1000x pada. Komputer yang terhubung dengan mikroskop memiliki *software optilab viewer* untuk merekam gambar. Masing-masing preparat diambil sebanyak 10 lapang pandang. Tiap lapang pandang dihitung ekspresi p53 yang ditunjukkan dengan gambar sel berwarna coklat muda hingga gelap, kemudian dibandingkan dengan seluruh jumlah sel dalam 1 lapang pandang dan dijadikan dalam bentuk persen. Persentase yang didapat tiap lapang pandang diinterpretasikan dalam skor proporsi Allred, kemudian seluruh hasil proporsi dihitung reratanya. Terakhir tentukan skor intensitas p53 dengan menggunakan sistem skor Allred.



Gambar 8. Allred scoring (Allred, 2005).

Skor proporsi sel positif

- |            |            |
|------------|------------|
| 1. (-)     | : 0        |
| 2. (+)     | : < 1%     |
| 3. (++)    | : 1 – 10%  |
| 4. (+++)   | : 10 – 33% |
| 5. (++++)  | : 33 – 66% |
| 6. (+++++) | : > 66%    |

Skor intensitas

- |        |           |
|--------|-----------|
| 1. (0) | : negatif |
| 2. (1) | : lemah   |
| 3. (2) | : sedang  |
| 4. (3) | : kuat    |

### 3.8 Analisis Data

Perbedaan ekspresi P53 antar kelompok diuji dengan uji statistik *Analyze of Varian* atau ANOVA. Sebelum dilakukan uji ANOVA dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *shapiro-wilk*. Jika hasil analisis data yang didapatkan signifikan ( $p > 0,05$ ) atau dapat diartikan distribusi kelompok data normal maka dapat dilanjutkan dengan uji varian data atau homogenitas.



### **3.9 Etika Penelitian**

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian Handayani yang dilakukan pada tahun 2017 dengan judul “Pengaruh Obat Anastesi Ketamin dan Ketamin-Xylacin Terhadap Ekspresi Protein P53 Otak Tikus Pasca Transient Bilateral Common Carotis Artery Occlusion (tBCCAO)” telah mendapatkan ethical clearance dengan nomor surat 08/Ka.Kom.Et/70/KE/XI/2017.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

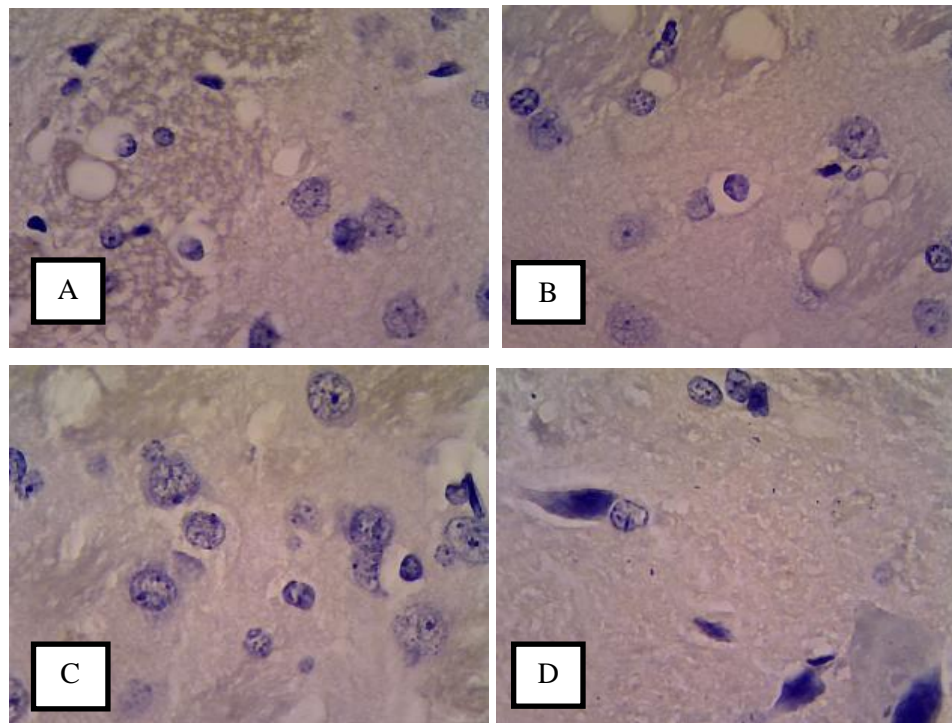
#### 4.1. Hasil Penelitian

Penelitian dengan judul “Pengaruh Anestesi *Ketamine-xylazine* Terhadap Ekspresi P53 Striatum Otak Tikus Pasca BCCAO (*Bilateral Common Carotid Artery Occlusion*)” telah dilaksanakan pada bulan Maret 2018 hingga bulan Desember 2018 dan telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan nomor surat **08/Ka.Kom.Et/70/KE/XI/2017**.

##### 4.1.1. Hasil Pengamatan pada Area Striatum

Perlakuan dalam penelitian ini berupa *shame operated* dengan anestesi *ketamine-xylazine*, *shame operated* dengan *ketamine*, ligasi BCCAO dengan anestesi *ketamine-xylazine* dan ligasi BCCAO dengan anestesi *ketamine* menunjukkan hasil signifikan yang dapat mempengaruhi jumlah sel neuron striatum tikus. Total preparat yang didapatkan dari pembuatan menggunakan pengecatan IHC (*imunohistokimia*) sejumlah 22 preparat. Selama penelitian 22 preparat otak tikus bagian striatum telah diamati dan dihitung ekspresi p53 pada selnya. Sampel yang diambil terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan. Pembagian kelompok tersebut meliputi kelompok kontrol atau *shame operated* dengan anestesi *ketamine-xylazine* dan *shame operated* dengan anestesi *ketamine* saja, sedangkan kelompok perlakuan BCCAO dengan anestesi *ketamine-xylazine* dan BCCAO dengan anestesi *ketamine* saja. Preparat diberi nomor dan diacak oleh orang lain dan peneliti tidak mengetahui nomor masing–masing kelompok sehingga dapat mengurangi bias. Lapangan pandang yang diambil saat pengambilan foto menggunakan mikroskop adalah seluruh lapangan pandang yang memenuhi peta stereotaxis otak tikus. Sel neuron otak tikus bagian striatum diamati menggunakan perbesaran 1000x menggunakan mikroskop CX 21 yang terhubung dengan kamera optilab dan perangkat komputer yang memiliki *software Optilab Viewer*.

Sel neuron yang dihitung adalah sel yang terletak pada area striatum tikus menyesuaikan dengan peta stereotaxis dengan kriteria bentuk sel bulat, utuh dan memiliki anak inti yang jelas. Seluruh lapang pandang tersebut diambil hanya 10 lapang secara acak sehingga mengurangi bias. Setelah menghitung ekspresi p53 tiap sel, peneliti diberitahu kelompok mana yang merupakan *shame operated dengan anestesi ketamine-xylazine*, *shame operated dengan ketamine* saja, BCCAO dengan anestesi *ketamine-xylazine* ataupun BCCAO dengan anestesi *ketamine* saja untuk memasukkan data ke *software* statistik.



Gambar 9. Hasil pengamatan sel neuron striatum. (A) gambaran histologi sel neuron striatum kelompok 1 perbesaran 1000x; (B) gambaran histologi sel neuron striatum kelompok 2 perbesaran 1000x; (C) gambaran histologi sel neuron striatum kelompok 3 perbesaran 1000x; (D) gambaran histologi sel neuron striatum kelompok 4 perbesaran 1000x

#### 4.1.2. Hasil Ekspresi P53 Sel Neuron Striatum Pasca Anestesi

Perhitungan ekspresi sel neuron dilakukan pada semua gambar preparat. Sebanyak 10 gambar pada masing-masing preparat. Rerata ekspresi P53 preparat dengan perlakuan berupa *shame operated* dan

BCCAO yang dianestesi menggunakan *ketamine* mendapatkan hasil pada tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1. Rerata Ekspresi P53 Sel Neuron Striatum Pasca Anestesi *Ketamine*

<b>Tikus <i>Shame Operated</i></b>			<b>Tikus Operasi BCCAO</b>	
<b>No.</b>	<b>Kode Tikus</b>	<b>Jumlah Ekspresi P53</b>	<b>Kode Tikus</b>	<b>Jumlah Ekspresi P53</b>
1.	SK1	4.58	PK1	4.90
2.	SK2	4.79	PK2	4.98
3.	SK3	4.75	PK3	5.00
4.	SK4	4.82	PK4	4.81
<b>Total</b>		<b>18.94</b>	<b>Total</b>	<b>19.69</b>

SK: Kelompok *shame operated* dengan anestesi *ketamine*, PK: Kelompok perlakuan BCCAO dengan anestesi *ketamine*

Kemudian pada preparat striatum otak tikus dengan perlakuan berupa *shame operated* dan BCCAO yang dianestesi menggunakan *ketamine-xylazine* dilakukan perhitungan seperti sebelumnya. Hasil rerata ekspresi P53 terdapat pada tabel 2 di bawah ini.

Tabel 2. Rerata Ekspresi P53 Sel Neuron Striatum Pasca Anestesi *Ketamine-xylazine*

<b>Tikus <i>Shame Operated</i></b>			<b>Tikus Operasi BCCAO</b>	
<b>No.</b>	<b>Kode Tikus</b>	<b>Jumlah Ekspresi P53</b>	<b>Kode Tikus</b>	<b>Jumlah Ekspresi P53</b>
1.	SKX1	5.12	PKX1	4.87
2.	SKX2	4.76	PKX2	4.82
3.	SKX3	4.64	PKX3	4.61
4.	SKX4	4.55	PKX4	4.85
<b>Total</b>		<b>19.07</b>	<b>Total</b>	<b>19.15</b>

SK: Kelompok *shame operated* dengan anestesi *ketamine-xylazine*, PK: Kelompok perlakuan BCCAO dengan anestesi *ketamine-xylazine*

#### 4.1.3. Analisis Data Ekspresi P53 Striatum Otak Tikus

Data yang telah diperoleh, meliputi kelompok *shame operated* dengan anestesi *ketamine-xylazine* dan *shame operated* dengan anestesi *ketamine*, kelompok BCCAO dengan anestesi *ketamine-xylazine* dan BCCAO dengan anestesi *ketamine* kemudian dianalisis menggunakan metode *One Way Analysis of Variance (ANOVA)*.

Pertama, data dari seluruh kelompok dilakukan uji normalitas. Jumlah data yang digunakan adalah 22 preparat yaitu mencakup <50 sehingga uji normalitas yang digunakan adalah *Saphiro-Wilk*. Hasil yang didapatkan dari uji normalitas antara lain; kelompok *shame operated* dengan anestesi *ketamine-xylazine*  $p=0.251$ ; kelompok *shame operated* dengan anestesi *ketamine*  $p=0.468$ ; kelompok BCCAO dengan anestesi *ketamine-xylazine*  $p=0.054$ ; dan kelompok BCCAO dengan anestesi

*ketamine*  $p=0.544$ . Uji normalitas didapatkan hasil normal ( $p>0,05$ ) pada seluruh kelompok sehingga dapat diinterpretasikan bahwa data terdistribusi normal.

Kemudian dilihat variansi homogenitas data menggunakan uji *Levene*. Hasil yang didapatkan yaitu signifikansi sebesar  $P=0,466$  ( $P>0,05$ ) sehingga dapat diinterpretasikan data penelitian memiliki variasi data yang sama. Kemudian dilanjutkan dengan Menggunakan uji *One Way ANOVA* didapatkan hasil sebagai berikut.

Tabel 3. Hasil Uji ANOVA Rerata Ekspresi P53 Sel Neuron Striatum

Kelompok	Rerata	SD	ANOVA
<i>Shame Operated</i> dengan anestesi <i>ketamine-xylazine</i> (SKX)	4.750	0.20	
<i>Shame Operated</i> dengan anestesi <i>ketamine</i> (SK)	4.735	0.13	
BCCAO dengan anestesi <i>ketamine-xylazine</i> (PKX)	4.945	0.33	0,269
BCCAO dengan anestesi <i>ketamine</i> (PK)	4.922	0.08	

Berdasarkan hasil Uji *One Way ANOVA* didapatkan hasil  $p=0.269$  ( $p>0,05$ ) yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan tidak bermakna ekspresi sel neuron striatum antara kelompok dengan anestesi *ketamine xylazine* dan *ketamine* baik dengan *shame operated* maupun operasi BCCAO.

## 4.2. Pembahasan

Berdasarkan hasil analisis dengan uji *One Way ANOVA* dihasilkan rerata ekspresi P53 paling tinggi pada striatum otak tikus yang diamati menggunakan

mikroskop yang terhubung optilab yaitu terdapat pada kelompok BCCAO dengan anestesi *ketamine-xylazine* dengan skor sebanyak 4.945 dan rerata ekspresi P53 paling rendah pada striatum otak tikus yang diamati menggunakan mikroskop yang terhubung optilab yaitu terdapat pada kelompok *shame operated* dengan anestesi *ketamine* dengan skor sebanyak 4.735. Hal tersebut menandakan bahwa pemberian anestesi *ketamine* maupun *ketamine-xylazine* tidak memberikan perbedaan yang berarti sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa tidak terdapat pengaruh anestesi *ketamine-xylazine* terhadap ekspresi P53 pada striatum otak tikus (*Rattus norvegicus*) pasca BCCAO.

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa rerata ekspresi P53 striatum otak tikus dengan perlakuan BCCAO lebih banyak jika dibandingkan dengan kelompok kontrol *shame operated*. Hal tersebut dapat menandakan bahwa BCCAO menyebabkan iskemia pada otak sehingga menimbulkan ekspresi P53 lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol. BCCAO merupakan rat stroke model yang biasanya digunakan dalam penelitian untuk menciptakan keadaan stroke dalam uji terapi stroke. BCCAO merupakan salah satu teknik oklusi arteri carotis comunis yang dapat menyebabkan aliran darah ke otak menjadi berkurang dan menciptakan kondisi iskemia otak. Iskemia otak dapat memicu kerusakan saraf dengan mekanisme apoptosis sel neuron. Mekanisme apoptosis diinisiasi oleh depolarisasi membran mitokondria dan aktivitas reseptor glutamat berlebih kemudian menjadi stres seluler yang mengaktifasi peningkatan ekspresi p53 yang akan menginduksi ekspresi *pro-apoptotic Bcl-2 family members bax (Bcl-2 associated x protein)* dan *bak (Bcl-2 associated killer)*. Terjadi peningkatan permeabilitas membran mitokondria luar sehingga terjadi pelepasan *cytochrome c* ke sitoplasma yang kemudian mengaktifasi caspase *cascade* apoptosis dan berujung pada kematian neuron (Niizuma, 2010; Setyopranoto, 2012).

*Ketamine* merupakan anestesi dengan sifat *NMDA(N-metil-D-aspartat) receptor blocker* selektif. *Ketamine* bekerja dengan menghambat efek membran dan eksitasi neurotransmitter asam glutamat pada reseptor NMDA sehingga

menekan influks ion kalsium untuk menghindari cedera otak (Zhang *et al.*, 2007). Namun ketamine dapat menimbulkan efek samping jika digunakan berulang dan tidak tepat dosis. Efek samping yang ditimbulkan berupa degenerasi saraf otak dan defek kognitif yang berkepanjangan dalam proses belajar dan memori. Timbulnya efek samping ini dikarenakan terjadinya peningkatan ROS berlebihan yang dapat mengaktivasi HIF-1 $\alpha$  yang kemudian menginduksi apoptosis neuronal. HIF-1 $\alpha$  merupakan subunit dari HIF (heterodinamic transcription factor) yang berperan penting dalam homeostasis oksigen sel dan sistemik. HIF-1 $\alpha$  aktif pada kondisi hipoksia dan kondisi non hipoksia seperti perlukaan pada otak yang disebabkan trauma. Selain itu peningkatan ROS berlebihan tidak hanya meningkatkan ekspresi HIF-1 $\alpha$ , namun juga protein apoptotik seperti P53, BNIP3 dan Bax, protein anti-apoptotik Bcl2, caspase 3, serta enzim yang memediasi kematian sel melalui apoptosis (Yan *et al.*, 2014).

Sementara itu Xylazine merupakan anestesi yang memiliki sifat analgetik, sedatif, *muscle relaxant*, dan menurunkan tekanan darah sehingga dapat menekan efek samping dari *ketamine*. *Xylazine* bekerja pada reseptor presinaptik dan postsinaptik sistem saraf pusat, serta sebagai agonis adrenergik pada sistem saraf perifer sehingga dapat menginhibisi sistem saraf simpatis. Mekanisme kerja *xylazine* dapat memberikan efek penurunan frekuensi respirasi, tekanan darah dan denyut jantung, sehingga *xylazine* diduga dapat digunakan sebagai anestesi bersifat neuroprotektif dan baik digunakan sebagai anestesi lokal (Yadav, *et al.*, 2008).

Berdasarkan penelitian Ferro (2007) didapatkan hasil kombinasi *ketamine-xylazine* mampu memperlambat degenerasi saraf namun tidak dapat menghentikan kerusakan saraf. Efek neuroprotektif dari *ketamine-xylazine* dapat mencegah pemburukan dari memori otak namun tidak dapat mencegah pemburukan motorik pada kondisi degenerasi saraf (Ferro *et al.*, 2007). Menurut Helmer (2003), anestesi *ketamine-xylazine* memiliki sifat protektif terhadap sel saraf dalam kondisi hipoksia. Kombinasi *ketamine-xylazine* dapat mengubah atau bahkan menggagalkan cascade inflamasi dan faktor transkripsi yang mengatur ekspresi



sel sehingga dapat melindungi sel saraf dari kerusakan dalam kondisi hipoksia (Helmer *et al.*, 2003).

Pada penelitian ini didapatkan hasil tidak ada perbedaan bermakna ekspresi P53 striatum otak tikus antara kelompok dengan pemberian anestesi *ketamine* maupun kelompok dengan pemberian anestesi *ketamine-xylazine* ditunjukkan dengan hasil analisis data uji One Way ANOVA  $p > 0.05$ . Penelitian lain yang dilakukan Linou (2015) dengan membandingkan anestesi *isoflurane* dan *ketamine-xylazine* menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan pada morfologi dan jumlah apoptotik neuron diantara kedua kelompok tersebut. Diketahui anestesi *isoflurane* bersifat tidak jauh berbeda dengan *ketamine* yaitu bekerja sebagai antagonis reseptor glutamat NMDA sehingga dapat menginduksi neuroproteksi. Jika dibandingkan antara anestesi *ketamine* maupun *isoflurane* ditemukan hasil bahwa efek neuroproteksi *ketamine* lebih rendah dari anestesi *isoflurane* pada penelitian kerusakan otak akibat trauma, selain itu diketahui bahwa manfaat neuroproteksi setelah anestesi *ketamine* dapat bertahan lama. Hal ini mendukung hasil penelitian penulis bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan ekspresi P53 antara anestesi *ketamine* maupun *ketamine-xylazine* dikarenakan baik *ketamine* maupun *xylazine* sama-sama dapat memberikan efek neuroproteksi sehingga ekspresi protein apoptotik P53 setelah diberikan anestesi tersebut tidak berbeda jauh (Linou *et al.*, 2015).

## BAB V

### KESIMPULAN

#### 5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat diambil kesimpulan bahwa tidak terdapat pengaruh signifikan ( $p > 0.05$ ) antara pemberian anestesi *ketamine* maupun *ketamine-xylazine* terhadap ekspresi P53 pada neuron striatum otak tikus *Rattus norvegicus* pasca BCCAO (*Bilateral Common Carotid Artery Occlusion*).

#### 5.2. Saran

Agar penelitian setelahnya dapat menjadi lebih baik, penulis memberikan beberapa saran, diantaranya adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh durasi BCCAO terhadap ekspresi P53 dan pengaruh teknik pembuatan stroke model terhadap ekspresi P53.
2. Dibutuhkan jumlah hewan coba yang lebih dari 5 ekor pada tiap kelompok untuk menghindari terjadinya kehilangan data apabila terdapat hewan percobaan yang mati selama proses penelitian.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh durasi *Bilateral Common Carotid Artery Occlusion* untuk melihat *marker* biokimiawi seperti kadar ROS, protein pro apoptosis, dan protein anti apoptosis.

## DAFTAR PUSTAKA

- American Heart Association. (2015). Heart Disease and Stroke Statistic. *AHA Staistical Update*.
- Allred, J. C., (2005) 'Radiative hydrodynamic models of the optical and ultraviolet'. *The Astrophysical Journal*. pp. 573–586.
- Bacigaluppi, M., Comi, G. and Hermann, D. M. (2010) 'Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia~!2009-05-11~!2009-12-22~!2010-06-14~!', *The Open Neurology Journal*, 4(2), pp. 34–38. doi: 10.2174/1874205X01004020034.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (2013) 'Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2013', *Laporan Nasional 2013*, pp. 1–384. doi: 1 Desember 2013.
- Casals, J. B. (2011) 'The use of animal models for stroke research: a review.', *Comparative medicine*, 61(4), pp. 305–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22330245> %5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3155396>.
- Charan, J. and Kantharia, N. (2013) 'How to calculate sample size in animal studies?', *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 4(4), p. 303. doi: 10.4103/0976-500X.119726.
- Chauhan, G. and Debette, S. (2016) 'Genetic Risk Factors for Ischemic and Hemorrhagic Stroke', *Current Cardiology Reports*. Current Cardiology Reports, 18(12). doi: 10.1007/s11886-016-0804-z.
- Ferdinand, P. and Roffe, C. (2016) 'Hypoxia after stroke: a review of experimental and clinical evidence', *Experimental & Translational Stroke Medicine*. BioMed Central, 8(1), p. 9. doi: 10.1186/s13231-016-0023-0.
- Ferro, M. M. (2007) 'Neuroprotective effect of ketamine/xylazine on two rat models of Parkinson's disease', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(1), pp. 89–96. doi: 10.1590/S0100-879X2006005000053.
- Filichia, E. (2015) 'Forebrain neuronal specific ablation of p53 gene provides protection in a cortical ischemic stroke model', *Neuroscience*, 295, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.03.018.
- Harsay, H. A. (2011) 'Functional Connectivity of the Striatum Links Motivation to Action Control in Humans', *Journal of Neuroscience*, 31(29), pp. 10701–10711. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5415-10.2011.
- Helmer, K. S. (2003) 'Ketamine / Xylazine Attenuates LPS-Induced iNOS Expression in Various Rat Tissues 1 , 2', 78, pp. 70–78. doi:

10.1016/S0022-4804(03)00138-0.

- Holm, L. (2011) *Focal ischemic reperfusion stroke model in rats and the role of galanin*.
- IBRC. 2013. *Stroke Modelling, TTC Staining, Immunohistochemistry, and Neural Tracing technique*. Workshop Module. Surya University Campus, Tangerang.
- Jing, Z. (2015) 'Chronic cerebral hypoperfusion induces vascular plasticity and hemodynamics but also neuronal degeneration and cognitive impairment', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(8), pp. 1249–1259. doi: 10.1038/jcbfm.2015.55.
- Kumar, D., Bouldin, T. W. and Berger, R. G. (2010) 'A case of progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with infliximab', *Arthritis and Rheumatism*, 62(11), pp. 3191–3195. doi: 10.1002/art.27687.
- Kurdi, M., Theerth, K. and Deva, R. (2014) 'Ketamine: Current applications in anesthesia, pain, and critical care', *Anesthesia: Essays and Researches*, 8(3), p. 283. doi: 10.4103/0259-1162.143110.
- Li, Y. (2010) 'Increased GAD expression in the striatum after transient cerebral ischemia', *Molecular and Cellular Neuroscience*. Elsevier Inc., 45(4), pp. 370–377. doi: 10.1016/j.mcn.2010.07.010.
- Linou, M. (2015) 'Isoflurane and Ketamine / Xylazine Anesthesia do not Influence the Neuroprotective Effects of Simvastatin in a Model of Permanent Cerebral Ischemia', *Journal of Neurological Research*, 3(1), pp. 1–10. doi: 10.9734/BJMMR/2015/19288.
- Majid, A. (2014) 'Neuroprotection in Stroke : Past , Present , and Future', 2014.
- Mărgăritescu, O. (2009) 'Histopathological changes in acute ischemic stroke.', *Romanian journal of morphology and embryology*, 50(3), pp. 327–339.
- Mozaffarian, D. (2016) *Heart disease and stroke statistics-2016 update a report from the American Heart Association*, *Circulation*. doi: 10.1161/CIR.0000000000000350.
- Niizuma, K., Endo, H. and Chan, P. H. (2010) 'Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival', *Journal of Neurochemistry*, 109(Suppl 1), pp. 133–138. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05897.x.Oxidative.
- Petegnief, V. and Planas, A. M. (2013) 'SIRT1 Regulation Modulates Stroke Outcome', *Translational Stroke Research*, 4(6), pp. 663–671. doi:

10.1007/s12975-013-0277-y.

ROTHWELL, J. C. (2011) 'the Motor Functions of the Basal Ganglia', *Journal of Integrative Neuroscience*, 10(3), pp. 303–315. doi: 10.1142/S0219635211002798.

Setyopranoto, i. (2011). Stroke: Gejala dan Penatalaksanaan. *Continuing Medical Education*, 38, 247-250.

Sitorus, F., & Ranakusuma, T. A. (2014). Penyakit Serebrovaskular Serangan Otak-Brain Attack : Transient Ischemic Attack (TIA)-Reversible Ischemic Neurologic Defisit (RIND)-Stroke. Dalam S. Setiati, I. Alwi, A. W. Sudoyo, M. Simadibrata, B. Setyohadi, & A. F. Syam (Penyunt.), *Ilmu Penyakit Dalam* (hal. 1557-1568). Jakarta: Interna Publishing.

Soria, G. (2013) 'The Ins and Outs of the BCCAO Model for Chronic Hypoperfusion: A Multimodal and Longitudinal MRI Approach', *PLoS ONE*, 8(9), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0074631.

Tajiri, S., Oyadomari, S., Yano, S. (2004) 'reticulum stress pathway involving CHOP Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP', (April 2014). doi: 10.1038/sj.cdd.4401365.

Van der Worp, H. B. (2007) 'Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis', *Brain*, 130(12), pp. 3063–3074. doi: 10.1093/brain/awm083.

Wang-fischer, Y. (2009). *Manual of Stroke Models In Rats*. Boca Raton: Taylor&Francis Group.

Yadav, G. U., Thorat, M. G. and Bedarkar, S. N. (2008) 'Efficacy of xylazine as a sedative in cattle', *Veterinary World*, 1(11), p. 340. doi: 10.5455/vetworld.2008.340.

Yan, J., Huang, Y. (2014) 'Repeated Administration of Ketamine can Induce Hippocampal Neurodegeneration and Long-Term Cognitive Impairment via the ROS / HIF-1 Pathway in Developing Rats', pp. 1715–1732. doi: 10.1159/000362953.


Yang, S.-H. (2006) 'Endovascular middle cerebral artery occlusion in rats as a model for studying vascular dementia.', *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 28(3), pp. 297–307. doi: 10.1007/s11357-006-9026-4.

Yueniwati, Y. 2014. *Deteksi Dini Stroke Iskemia dengan Pemeriksaan Ultrasonografi Vaskular dan Variasi Genetik*. Universitas Brawijaya Press. Malang.

Zhang, J. Z. *et al.* (2007) 'Inhibitory effect of ketamine on phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase1/2 following brain ischemia and reperfusion in rats with hyperglycemia', *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59(3–4), pp. 227–235. doi: 10.1016/j.etp.2007.05.002.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Keterangan Lolos Kaji Etik



*Universitas Islam Indonesia*  
**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 : 08 /Ka.Kom.Et/70/KE/XI/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 Obat Anestesi Ketamin dan Ketamin-Xylacin terhadap Ekspresi Protein P53 Otak Tikus Pasca Transient Bilateral Common Carotis Artery Occlusion (tBCCAO)."**

**Peneliti Utama** : Dr. dr. Untung Widodo, Sp.An  
*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, 17 November 2017  
- Ketua  
Chairman  
Prof. Dr. Dra. 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 tangan 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

### Explore

#### Notes

Output Created		28-NOV-2018 20:55:52
Comments		
	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
Input	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	22
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values for dependent variables are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on cases with no missing values for any dependent variable or factor used.



Syntax	EXAMINE VARIABLES=Score BY Intervensi  /PLOT BOXPLOT STEMLEAF NPLOT  /COMPARE GROUPS  /STATISTICS DESCRIPTIVES  /CINTERVAL 95  /MISSING LISTWISE  /NOTOTAL.
Resources	Processor Time 00:00:05,23 Elapsed Time 00:00:17,49

[DataSet0]

## Intervensi

### Case Processing Summary

	Intervensi	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
	SKX	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	SK	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
Score	PKX	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	PK	4	100.0%	0	0.0%	4	100.0%

**Descriptives**

Intervensi		Statistic	Std. Error
	Mean	4.7500	.08287
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 4.5370	
		Upper Bound 4.9630	
	5% Trimmed Mean	4.7406	
	Median	4.7000	
	Variance	.041	
SKX	Std. Deviation	.20298	
	Minimum	4.55	
	Maximum	5.12	
Score	Range	.57	
	Interquartile Range	.27	
	Skewness	1.425	.845
	Kurtosis	2.287	1.741
	Mean	4.7350	.05649
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 4.5898	
		Upper Bound 4.8802	
SK	5% Trimmed Mean	4.7350	
	Median	4.7700	
	Variance	.019	

		Std. Deviation	.13838	
		Minimum	4.56	
		Maximum	4.91	
		Range	.35	
		Interquartile Range	.27	
		Skewness	-.333	.845
		Kurtosis	-1.451	1.741
		Mean	4.9450	.13488
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 4.5983 Upper Bound 5.2917	
		5% Trimmed Mean	4.9283	
		Median	4.8600	
		Variance	.109	
	PKX	Std. Deviation	.33038	
		Minimum	4.61	
		Maximum	5.58	
		Range	.97	
		Interquartile Range	.33	
		Skewness	1.790	.845
		Kurtosis	4.064	1.741
		Mean	4.9225	.04328
	PK	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 4.7848	

Mean	Upper Bound	5.0602	
5% Trimmed Mean		4.9244	
Median		4.9400	
Variance		.007	
Std. Deviation		.08655	
Minimum		4.81	
Maximum		5.00	
Range		.19	
Interquartile Range		.16	
Skewness		-.802	1.014
Kurtosis		-1.180	2.619

### Tests of Normality

Intervensi	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
SKX	.236	6	.200*	.876	6	.251
SK	.210	6	.200*	.915	6	.468
PKX	.339	6	.030	.796	6	.054
PK	.247	4	.	.921	4	.544

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

a. Lilliefors Significance Correction

### Test of Homogeneity of Variances

Score

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.888	3	18	.466

### ANOVA

Score

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.206	3	.069	1.422	.269
Within Groups	.870	18	.048		
Total	1.076	21			

ONEWAY Score BY Intervensi