

## ARTIKEL ASLI



### EFEK REMOTE ISCHEMIC PRECONDITIONING TERHADAP LUAS KEMATIAN OTOT JANTUNG TIKUS WISTAR PASCA INFARK MIOKARD YANG DIINDUKSI ISOPROTERENOL

Rachmatu Bill M<sup>1)</sup>, Novi Angriyani<sup>2)</sup>, Noor Wijayahadi<sup>3)</sup>, Sulistiyati Bayu U<sup>2)</sup>, Satrio Adi W<sup>4)</sup>

#### THE EFFECT OF REMOTE ISCHEMIC PRECONDITIONING TO THE AREA OF WISTAR RAT CARDIAC MUSCLE DEATH AFTER MYOCARDIAL INFARCTION INDUCED BY ISOPROTERENOL

#### ABSTRACT

**Background:** Myocardial infarction is one of the death causing diseases. Myocardial infarction may occur due to prolonged ischemia in cardiac muscle. The gold standard indicator of myocardial infarction is histopathology. There is a brief and transient ischemia of an organ prior myocardial infarction which can protect the cardiac muscle from damage called RIPC. The objectives of this study was to determine the effect of RIPC to the area of rat cardiac muscle death after myocardial infarction induced by isoproterenol.

**Methods:** The study was true experimental design with randomized posttest only with control group design. A sample of 21 male Wistar rats were divided into 3 groups: control group (K), the RIPC 3x5 minutestreatment group (P1), and the RIPC 3x15 minutestreatment group (P2). The three groups were injected with isoproterenol to induce myocardial infarction. The area of Wistar rat cardiac muscle death was measured using histopathologic examination. Statistical test using the Mann Whitney-U test.

**Results:** Scoring average area of cardiac muscle death in the control group at 4.0000, the treatment group RIPC 3x5 minutes at 2.8957, and the treatment group RIPC 3x15 minutes of 1.3714. Mann-Whitney U test showed significant difference of cardiac muscle death in the control group and the RIPC 3x5 minutes treatment group ( $p = 0.025$ ) and there is also a significant difference between the control group and the RIPC 3x15 minutes treatment group ( $p = 0.001$ ).

**Conclusion:** There are differences of cardiac muscle death between Wistar rats P1 group and P2 group compared with K group.

**Key words:** RIPC, myocardial infarction, Isoproterenol.

#### ABSTRAK

**Latar belakang:** Infark miokard adalah salah satu penyakit yang paling banyak menyebabkan kematian. Infark miokard dapat terjadi karena adanya iskemi berkepanjangan pada otot jantung. Baku emas indikator terjadinya infark miokard adalah pemeriksaan histopatologi. Terdapat suatu iskemi singkat dan sementara suatu organ sebelum infark miokard yang dapat melindungi otot jantung dari kerusakan yang disebut RIPC. Penelitian ini untuk mengetahui efek RIPC terhadap luas kematian otot jantung tikus pasca infark miokard yang diinduksi isoproterenol.

**Metode:** Penelitian eksperimental murni dengan rancangan *randomized posttest only control group design*. Sampel sebanyak 21 ekor tikus wistar jantan yang dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan RIPC 3x5 menit, dan kelompok perlakuan RIPC 3x15 menit. Ketiga kelompok tersebut diinjeksi dengan isoproterenol untuk menginduksi infark miokard. Luas kematian otot jantung tikus wistar diukur menggunakan pemeriksaan histopatologi. Uji statistik menggunakan Uji *Mann Whitney-U*.

**Hasil:** Skoring luas kematian otot jantung rerata pada kelompok kontrol sebesar 4,0000, kelompok perlakuan RIPC 3x5 menit sebesar 2,8957, dan kelompok perlakuan RIPC 3x15 menit sebesar 1,3714. Uji *Mann Whitney-U* perbedaan bermakna pada luas kematian otot jantung tikus Wistar pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan RIPC 3x5 menit ( $p=0,025$ ) serta terdapat perbedaan bermakna antara luas kematian otot jantung tikus Wistar pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan RIPC 3x15 menit ( $p=0,001$ ).

<sup>1)</sup> Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro 2013

<sup>2)</sup> Bagian Kardiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

<sup>3)</sup> Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

<sup>4)</sup> Bagian Anestesiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

**Simpulan:** Terdapat perbedaan luas kematian otot jantung antara tikus wistar yang diberi perlakuan RIPC 3x5 menit (P1) dan RIPC 3x15 menit (P2) dengan yang tidak diberi perlakuan RIPC (K).

**Kata kunci:** RIPC, Infark Miokard, Isoproterenol.

## PENDAHULUAN

Infark miokard merupakan kejadian patologis dimana otot jantung mengalami nekrosis jaringan karena tidak mendapat suplai oksigen secara signifikan dan berkepanjangan.<sup>1-2</sup> Infark miokard merupakan penyebab utama kematian secara global<sup>3</sup>, biasa diawali dengan penyakit jantung koroner yang merupakan penyebab kematian nomor satu di dunia<sup>4</sup> dan menyebabkan 10 orang meninggal setiap harinya di Indonesia.<sup>5</sup> Banyak penelitian tentang penatalaksanaan infark miokard dan memberikan dampak yang positif dengan turunnya angka kematian pada pasien infark miokard.<sup>6-7</sup>

*Ischemic Preconditioning* adalah suatu eksperimen untuk membuat jaringan mengalami kekurangan suplai darah. Kejadian *ischemic preconditioning* pada jantung dapat melindungi miokardium terhadap iskemia berikutnya. Luas kematian jaringan pada pasien infark miokard yang pernah mengalami *ischemic preconditioning* jauh lebih sedikit dibanding pasien yang tidak pernah mengalami *ischemic preconditioning* sebelumnya.<sup>8</sup>

Pada penelitian sebelumnya banyak percobaan tentang *ischemic preconditioning* baik menggunakan pengikatan pada pembuluh darah koroner secara langsung, pengikatan pada pembuluh darah lainnya dengan menggunakan metode *remote ischemic preconditioning*, dan menggunakan obat dengan metode *mimicking ischemic preconditioning*. Dari penelitian tersebut terbukti jika *ischemic preconditioning* mampu menurunkan luas kematian jaringan pada otot jantung.

Meskipun sudah dilakukan berbagai penelitian mengenai RIPC, mekanisme dari RIPC masih belum diketahui secara pasti. Oleh sebab itu peneliti ingin mengetahui lebih lanjut mengenai efek dari RIPC sebagai kardioprotektor terhadap infark miokard.

## METODE

Penelitian ini termasuk eksperimental murni dengan desain *post test only with control group design* dengan tujuan mencari perbandingan luas

kematian otot jantung pada tikus wistar yang dilakukan RIPC dengan kelompok kontrol. Sampel penelitian 21 ekor tikus wistar jantan, umur 6-8 minggu, berat 200-250 gram, sehat dan tidak tampak cacat secara anatomi.

Besar sampel ditentukan berdasarkan ketentuan WHO yaitu minimal 5 ekor wistar untuk setiap perlakuan. Pada penelitian ini jumlah wistar jantan untuk setiap perlakuan sebanyak 7 ekor, sehingga jumlah mencit jantan yang dibutuhkan adalah 21 ekor.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah lama RIPC tikus wistar. Variabel terikat penelitian ini adalah luas kematian otot jantung tikus wistar terinduksi isoproterenol setelah RIPC.

Pada tiap kelompok penelitian dilakukan pengolahan dan analisis. Data primer berupa gambaran histopatologi kematian otot jantung yang diperoleh setelah dilakukan intervensi akan diolah menggunakan uji normalitas data *Shapiro-Wilk*. dilanjutkan dengan pengolahan data menggunakan uji *Mann Whitney-U*.

## HASIL

### Karakteristik Subyek Penelitian

Pada penelitian yang sudah dilakukan ini terdiri dari 3 kelompok dimana masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor hewan percobaan yaitu tikus wistar. Tikus wistar diadaptasi terlebih dahulu selama satu minggu dan setelah masa adaptasi selesai tidak ditemukan adanya tikus yang mati

Kelompok pertama adalah kelompok K sebagai kontrol yang hanya diberi pakan standar dan diinduksi dengan isoproterenol secara subkutan dengan dosis 10mg/kg BB satu kali sehari selama 2 hari untuk mendapatkan efek infark miokard.

Kelompok kedua adalah kelompok P1 sebagai kelompok perlakuan 1 yang diberi pakan standar dan RIPC selama 3 siklus oklusi 5 menit dan reperfusi selama 5 menit kemudian diinduksi dengan isoproterenol secara subkutan dengan dosis 10mg/kg BB satu kali sehari selama 2 hari untuk

mendapatkan efek infark miokard.

Kelompok ketiga adalah kelompok P2 sebagai kelompok perlakuan 2 yang diberi pakan standar dan RIPC selama 3 siklus oklusi 15 menit dan reperfusi selama 15 menit kemudian diinduksi dengan isoproterenol secara subkutan dengan dosis 10mg/kg BB satu kali sehari selama 2 hari untuk mendapatkan efek infark miokard.

Pada hari ke-3, seluruh kelompok hewan coba dilakukan terminasi dengan cara dibius dengan inhalasi kloroform kemudian dilakukan pembedahan pada rongga dada tikus wistar untuk diambil jantungnya.

### Analisis Deskriptif dan Uji Hipotesis

Data yang diperoleh dari pemeriksaan luas kematian otot jantung adalah data rasio. Luas kematian otot jantung diukur menggunakan metode histopatologi. Analisis deskriptif luas kematian otot jantung dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Analisis Deskriptif

Kelompok	Mean	Std. Deviation
Kontrol	4,0000	0,00000
Perlakuan 1	2,8957	1,15562
Perlakuan 2	1,3714	0,44987

Kelompok kontrol memiliki rata-rata skoring sebesar 4,0000, sementara kelompok perlakuan 1 memiliki rata-rata skoring yang lebih rendah yaitu 2,8957. Sedangkan kelompok perlakuan 2 memiliki rata-rata skoring yang paling rendah yaitu 1,3714.

Langkah pertama dalam analisis hipotesis adalah uji normalitas. Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah data yang ada terdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas yang dilakukan adalah uji *Sapphiro-Wilk* karena jumlah data kurang dari 50.

Tabel 2. Uji Normalitas *Sapphiro-Wilk*

Kelompok	p
Kontrol	Diabaikan
Perlakuan 1	0,150
Perlakuan 2	0,025

Dari tabel 2 di atas terdapat data tidak terdistribusi normal ( $p < 0,05$ ). Maka data akan dianalisis dengan uji *Mann Whitney-U*.

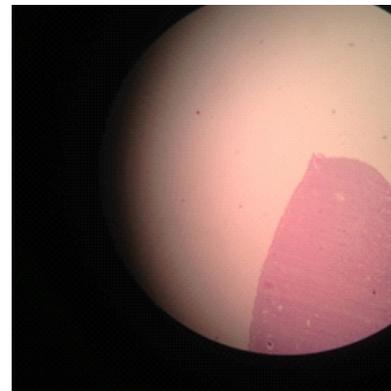
Tabel 3. Uji *Mann Whitney-U*

Kelompok	Signifikansi
Kontrol Perlakuan 1	0,025*
Perlakuan 2	0,001*

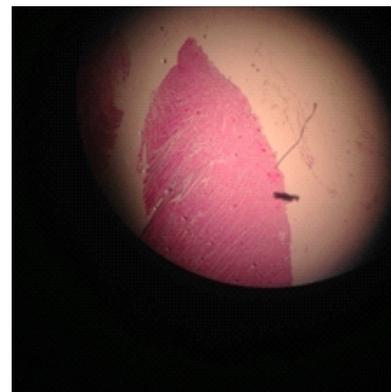
\*Uji *Mann Whitney-U* bermakna jika  $p < 0,05$

Uji *Mann Whitney-U* menunjukkan luas kematian otot jantung secara signifikan berbeda pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 1 ( $p < 0,05$ ) dan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan 2 ( $p < 0,05$ ).

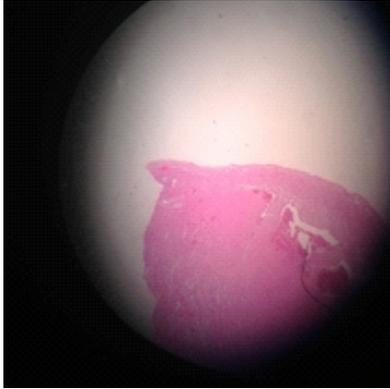
Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa luas kematian otot jantung pada kelompok 2 yaitu kelompok RIPC selama 3 siklus 5 menit oklusi dan 5 menit reperfusi lebih rendah daripada kelompok kontrol yang tidak dilakukan RIPC. Sementara luas kematian otot jantung pada kelompok 3 yaitu kelompok RIPC selama 3 siklus 15 menit oklusi dan 15 menit reperfusi juga lebih rendah daripada kelompok kontrol yang tidak dilakukan RIPC.



Gambar 1. Preparat Kelompok Kontrol



Gambar 2. Preparat Kelompok Perlakuan 1



Gambar 3. Preparat Kelompok Perlakuan 2

Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Przyklenk, K dkk dimana ditemukan kelompok RIPC yang dilakukan selama 3 siklus oklusi 5 menit dan reperfusi 5 menit di satu arteri koroner dapat melindungi daerah vaskularisasi arteri yang lain.<sup>9</sup> Sedangkan menurut penelitian lainnya yang dilakukan oleh C Ren dkk ditemukan kelompok RIPC yang dilakukan selama 3 siklus 15 menit oklusi dan 15 menit reperfusi memiliki perbedaan luas infark setelah stroke dengan kelompok control.<sup>10</sup>

Efek kardioprotektif dalam percobaan RIPC ini melibatkan aktivasi dari protein kinase, termasuk protein kinase c dan channel K<sub>ATP</sub> mitokondria. RIPC juga memodifikasi ekspresi gen, gen yang terlibat dalam perlindungan terhadap stress oksidatif dan sitoproteksi akan diregulasi, sedangkan gen proinflamasi akan ditekan.<sup>11</sup> Hipotesis sebuah penelitian menjelaskan bahwa RIPC dominan melibatkan multifaktorial sistemik antiinflamasi, saraf, dan jalur sinyal humoral yang mungkin berbeda dalam menanggapi berbagai rangsangan iskemia dan cenderung berinteraksi satu sama lain.<sup>12</sup>

RIPC dapat melalui 2 jalur dalam melindungi organ. Pertama melalui jalur komunikasi antar sel seperti jalur humoral, neural, dan efek-efek sistemik. Kedua melalui jalur molekuler melalui protein kinase dan faktor transkripsi. Kedua jalur ini akan mempengaruhi mediator seperti iNOS, HSP, dan COX-2 di mitokondria untuk membuka channel K<sub>ATP</sub> dan menginhibisi mPTP yang pada akhirnya mampu menghasilkan efek perlindungan organ.

Dalam penelitian ini juga menunjukkan bahwa isoproterenol dapat menyebabkan kematian otot

jantung tikus wistar dengan skoring infark mencapai angka 4. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa isoproterenol dapat menginduksi infark miokard pada tikus wistar. Isoproterenol merupakan suatu agen simpatomimetik sintetik yang bekerja sebagai agonis reseptor  $\beta$ -adrenergik. Injeksi secara subkutan dengan dosis yang adekuat pada hewan coba dapat menginduksi IM.<sup>13,14</sup> Mekanisme detail dan mendasari efek kardiotoxik isoproterenol dosis tinggi hingga mampu menginduksi IM antara lain karena faktor-faktor yang saling berinteraksi seperti hipoksia dan iskemia fungsional, insufisiensi koroner, perubahan patologi pada metabolisme, penurunan cadangan fosfat berenergi tinggi, peningkatan berlebihan ion kalsium intrasel, perubahan patologis pada kandungan elektrolit, dan stress oksidatif.<sup>15</sup> Atas dasar ini, isoproterenol dinilai dapat menginduksi IM tipe 2 sesuai *universal classification of myocardial infarction*.

Penelitian ini memiliki keterbatasan yaitu RIPC yang dilakukan berupa pengikatan pada ekstremitas dapat memicu stress dan perilaku yang agresif pada tikus hingga mengakibatkan perkelahian dengan tikus lain. Obat yang digunakan untuk induksi infark miokard merupakan obat yang cukup sulit ditemukan di Indonesia sehingga peneliti harus memesan dari luar negeri yang mengakibatkan penelitian menjadi terhambat.

## SIMPULAN

Terdapat perbedaan luas kematian otot jantung antara tikus wistar yang diberi perlakuan RIPC 3x5 menit (P1) dan RIPC 3x15 menit (P2) dengan yang tidak diberi perlakuan RIPC (K).

Diperlukan pemisahan antar hewan coba ketika dilakukan RIPC agar tidak menimbulkan perkelahian dan diperlukan variasi obat dalam melakukan induksi infark miokard yang lebih mudah dicari di Indonesia

## UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada dr. Novi Anggriyani Sp.JP, FIHA, dr. Noor Wijayahadi M.kes, Ph.D, dr. Sulistiyati Bayu Utami Ph.D, dr. Satrio Adi Wicaksono Sp.An serta pihak-pihak yang

telah membantu secara langsung maupun tidak langsung hingga penelitian dan penulisan artikel ini dapat terselesaikan dengan baik.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation*. 2012;126:2012-35.
2. Mendis S, Thygesen K, Kuulasmaa K, Giampaoli S, Mahonen M, Blackett KN, et al. World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision. *International Journal of Epidemiology*. 2011;40:139-46.
3. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2011.
4. WHO | Cardiovascular diseases (CVDs). World Health Organization; [cited 2016 Jan 21];
5. Balitbang Kemenkes RI. Riset Kesehatan Dasar 2013 [Internet]. Riset Kesehatan Dasar. Jakarta; 2013.
6. Rosamond WD, Chambless LE, Folsom AR, Cooper LS, Conwill DE, Clegg L, et al. Trends in the incidence of myocardial infarction and in mortality due to coronary heart disease, 1987 to 1994. *N Engl J Med*. 1998;339:861-7.
7. Fox CS, Evans JC, Larson MG, Kannel WB, Levy D. Temporal trends in coronary heart disease mortality and sudden cardiac death from 1950 to 1999: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004;110:522-7.
8. Thielmann, Matthias; Kottenberg, Eva; Kleinbongard, Petra; Wendt, Daniel (17 August 2013). "Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial" *The Lancet* 382 (9892): 597604. doi:10.1016/S0140-6736(13)61450-6
9. Karin Przyklenk, PhD, Peter Whittaker, PhD. Remote Ischemic Preconditioning: Current Knowledge, Unresolved Questions, and Future Priorities. 2011. 3-4 255-259.
10. Ren C, Gao X, Steinberg GK, Zhao H. Limb remote-preconditioning protects against focal ischemia in rats and contradicts the dogma of therapeutic time windows for preconditioning. *Neuroscience*. 2008;151(4):1099103.
11. Igor E. Konstantinov, MD, PhD, □, Sara Arab, PhD, □, Jia Li, MD, PhD, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. 2005. 13261332.
12. Remote Ischemic Preconditioning and Renoprotection: From Myth to a Novel Therapeutic Option? Natig Gassanov,\* Amir M. Nia,† Evren Caglayan,\* and Fikret Er\*
13. Engle SK, Jordan WH, Pritt ML, Chiang AY, Davis MA, Zimmermann JL, et al. Qualification of cardiac troponin I concentration in mouse serum using isoproterenol and implementation in pharmacology studies to accelerate drug development. *Toxicol Pathol*. 2009;37:617-28.
14. De S, Adhikari S, Devasagayam TPA. Cardioprotective effects of aminothiazole compound on isoproterenol-induced myocardial injury in mice. *Cell Biochem Biophys*. 2013;67(2):287-95.
15. Rona G. Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 1985 [cited 2016 Jan 21];17(4):291-306.

