

**PENGARUH KETAMIN INTRAVENA
TERHADAP KADAR *NITRIC OXIDE* MAKROFAG
MENCIT BALB/C YANG DIBERI LIPOPOLISAKARIDA**

***THE EFFECT OF INTRAVENOUS KETAMINE
ON MACROPHAGE NITRIC OXIDE LEVEL IN BALB/C MICE
WITH LIPOPOLYSACCHARIDE INDUCED***



Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Sarjana S-2
dan memperoleh keahlian dalam bidang Anestesiologi

Sulung Prastyo H

**PROGRAM PASCASARJANA
MAGISTER ILMU BIOMEDIK
DAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I
ANESTESIOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2009**

TESIS

**PENGARUH KETAMIN INTRAVENA
TERHADAP KADAR *NITRIC OXIDE* MAKROFAG
MENCIT BALB/C YANG DIBERI LIPOPOLISAKARIDA**

Akan dipertahankan didepan tim penguji dan dinyatakan
telah memenuhi syarat untuk diterima

disusun oleh

Sulung Prastyo H

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama

Pembimbing Kedua

dr. Witjaksono, Mkes. SpAn
NIP. 130 605 723

Prof. dr. Lisyani B. Suromo, SpPK(K)
NIP. 130 354 869

Mengetahui,

Ketua Program Studi
Anestesiologi dan Terapi Intensif
Fakultas Kedokteran UNDIP

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Biomedik
Program Pascasarjana UNDIP

dr. Uripno Budiono, SpAn(K)
NIP. 140 098 893

DR. dr. Winarto, SpMK, SpM
NIP. 130 675 157

ABSTRAK

PENGARUH KETAMIN INTRAVENA TERHADAP KADAR *NITRIC OXIDE* MAKROFAG MENCIT BALB/C YANG DIBERI LIPOPOLISAKARIDA

Latar belakang: *nitric oxide* (NO) berperan dalam patogenesis terjadinya hipotensi sistemik pada syok septic. Paparan endotoksin akan menyebabkan peningkatan pelepasan NO yang dipengaruhi oleh aktivasi sitokin proinflamasi. Ketamin merupakan obat anestesi yang digunakan untuk penderita sepsis, diduga menekan produksi sitokin proinflamasi akibat paparan lipopolisakarida (LPS), sehingga pembentukan NO dapat dihambat.

Tujuan: Menilai pengaruh pemberian ketamin dosis 0,1; 0,2 dan 0,4 mg intravena terhadap kadar NO mencit yang diberi lipopolisakarida intraperitoneal.

Metode: Penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *randomized post test only controlled group* pada 20 ekor mencit Balb/c yang disuntik lipopolisakarida intraperitoneal dan Ketamin dosis 0,1 ; 0,2 dan 0,4 mg intravena. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok secara random, yaitu K1 sebagai kontrol, K2 yang mendapat ketamin 0,1 mg, K3 yang mendapat ketamin 0,2 mg, dan K4 yang mendapat ketamin 0,4 mg. Pemeriksaan NO diambil dari kultur makrofag intraperitoneal setelah 6 jam pemberian ketamin. Uji statistik yang digunakan adalah parametrik ANOVA dan dilanjutkan *Post hoc* dengan derajat kemaknaan $p < 0,05$.

Hasil: Kadar rerata NO pada kelompok K1 ($43,2 \pm 2,2$), K2 ($14,8 \pm 1,2$), K3 ($11,6 \pm 2$) dan K4 ($10,7 \pm 1,7$). Terdapat perbedaan kadar NO yang signifikan pada kelompok K2, K3 dan K4 dibanding K1 dengan $p < 0,001$, K2 dibanding K3 dengan $p = 0,015$ serta K2 dibanding K4 dengan $p = 0,002$. Sedangkan antara kelompok K3 dibanding K4 tidak didapatkan perbedaan yang bermakna dengan $p = 0,402$.

Simpulan: Ketamin dapat menurunkan kadar NO makrofag intraperitoneal mencit secara signifikan. Ketamin dosis 0,2 mg intravena efektif untuk menurunkan kadar NO makrofag intraperitoneal.

Kata kunci: lipopolisakarida, ketamin, *nitric oxide* (NO).

ABSTRACT

THE EFFECT OF INTRAVENOUS KETAMINE ON MACROPHAGE NITRIC OXIDE LEVEL IN BALB/C MICE WITH LIPOPOLYSACCHARIDE INDUCED

Background: Nitric oxide (NO) has a potential role in pathogenesis of systemic hypotension in sepsis. Endotoxin increases the activity of the iNOS enzyme and NO release. Proinflammatory cytokines is inflammatory mediators implicated in the induction and activation of iNOS and NO release also. Ketamine is an anesthetic agent and commonly used for septic patients. This agent suppresses endotoxin induced proinflammatory cytokines production and blockade the activation of NF-kB, so the NO production can be inhibited.

Objective: to study the effect of Ketamine 0,1;0,2 and 0,4 mg intravenous on intraperitoneal NO level on Balb/c mice with intraperitoneal injection of lipopolysaccharide.

Methods: a randomized post test only controlled group laboratoric experimental studied on 20 male Balb/c mice divided into 4 groups and injected intraperitoneally with lipopolysaccharide 20mg/kg and 6 hours later were injected with ketamine . K1 as the control group ; K2, K3, and K4 administrered with ketamine 0,1;0,2; and 0,4 mg intravenously. NO was taken from peritoneal macrophage culture and observed by Grease method. The results were analyzed by ANOVA and post hoc statistical assays, with reliability $p < 0,05$.

Results: NO level K1(43,2±2,2), K2(14,8±1,2), K3(11,6±2) and K4(10,7±1,7). There were significant difference in NO level between K2,K3 and K4 than K1 ($p < 0,001$), K2 than K3 ($p = 0,015$) and K2 than K4 ($p = 0,002$). But there was no significant difference between K3 and K4 ($p = 0,402$).

Conclusion: Ketamine decreases nitric oxide level in mice intraperitoneal macrophages significantly. Ketamine 0,2 mg is the effective dose for decreasing intraperitoneal nitric oxide level.

Keywords: ketamine, lipopolysaccharide, nitric oxide.

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi atau lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan didalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Juni 2009

Sulung Prastyo H

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat, taufik dan hidayah-Nya, sehingga kami dapat menyelesaikan tugas dalam rangka mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis I di Bagian / SMF Anestesiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / Rumah Sakit Dr. Kariadi dan Program Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro Semarang.

Tesis ini dibuat dalam rangka menyelesaikan pendidikan spesialisasi anestesiologi dan magister Ilmu Biomedik yang kami tempuh. Adapun judul tesis adalah **“PENGARUH KETAMIN INTRAVENA TERHADAP KADAR NITRIC OXIDE MAKROFAG MENCIT BALB/C YANG DIBERI LIPOPOLISAKARIDA“**. Dengan tesis ini diharapkan dapat memberikan sumbangan pengetahuan tentang pengaruh ketamin terhadap kadar *Nitric Oxide* pada sepsis.

Pada kesempatan yang baik ini, ingin kami menyampaikan ucapan terimakasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada :

1. **Prof. DR. dr. Soesilo Wibowo, MmedSc, SpAnd(K)** selaku Rektor Universitas Diponegoro Semarang.
2. **dr. Soejoto, SpKK(K)** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

3. **dr. Hariyo Satoto, SpAn(K)** selaku Kepala Bagian / SMF Anestesiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro / Rumah Sakit Dr. Kariadi Semarang yang telah memberikan semua petunjuk serta kesempatan kepada kami untuk mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis I Anestesiologi dan Program Magister Ilmu Biomedik.
4. **dr. Uripno Budiono, SpAn(K)** selaku Ketua Program Studi Anestesiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro yang telah memberikan kesempatan pada kami untuk menempuh Program Pendidikan Dokter Spesialis I Anestesiologi dan Program Magister Ilmu Biomedik.
5. **dr. H. Witjaksono, SpAn(K), MKes** selaku guru sekaligus pembimbing I dalam penelitian ini, atas segala waktu, tenaga dan bimbingan yang diberikan sehingga tesis ini dapat selesai, kami mengucapkan terima kasih.
6. **Prof. dr. Lisyani B Suromo, SpPK(K)** selaku guru sekaligus pembimbing II dalam penelitian ini, atas segala waktu, tenaga dan bimbingan yang diberikan sehingga tesis ini dapat selesai, kami mengucapkan terima kasih.
7. Kepada guru-guru kami, staf pengajar Bagian Anestesiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro : **Prof. dr. Soenarjo, SpAn, KIC, KAKV ; Prof. dr. H. Marwoto, SpAn, KIC ; dr. H. Abdul Lian Siregar, SpAn, KNA ; dr. Ery Leksana, SpAn, KIC ; dr. H. Heru Dwi Jatmiko, SpAn, KAKV ; dr. M. Sofyan Harahap, SpAn, KNA ; dr. H. Widya Istanto Nurcahyo, SpAn, KAKV ; dr. Jati Listiyanto P, SpAn ; dr. Johan Arifin, SpAn ; dr. Doso Sutiyono, SpAn ; dr. Yulia villiastuti SpAn ; dr. Himawan SpAn ; dr. Aria Dian SpAn dan dr. Danu SpAn**

yang telah memberikan bimbingan, motivasi dan ilmu di bidang Anestesiologi kepada kami.

8. **Prof. Drs. Y. Warella, MPA, PhD** selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Diponegoro.
9. **DR. dr. Winarto, SpMK, SpM** selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro.
10. **Prof. DR. dr. Tjahjono, SpPA(K), FIAC** selaku pengelola Program Studi Magister Ilmu Biomedik Kelas Khusus PPDS I Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, atas motivasi yang diberikan kepada kami untuk menyelesaikan studi ini.
11. Guru-guru Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro yang telah memberi pengetahuan dan bimbingan kepada kami serta memberikan motivasi selama mengikuti program pendidikan magister dan penyusunan tesis ini.
12. Semua rekan sejawat Residen Bagian Anestesiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, karyawan karyawan Bagian Anestesiologi, karyawan karyawan Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro serta staf yang telah membantu kami selama dalam penelitian sehingga penyusunan tesis ini dapat selesai, kami mengucapkan terima kasih.
13. Karyawan karyawan Laboratorium Biokimia, Laboratorium CEBIOR Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, LPPT Universitas Gadjah Mada yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian ini.

Pada kesempatan ini pula dengan penuh kerendahan hati dan rasa cinta yang dalam, kami menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada kedua orangtua dan keluarga yang dengan penuh kesabaran dan kasih sayang senantiasa memberikan semangat dan dorongan sehingga kami dapat menyelesaikan tesis ini.

Kami menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu kami mengharapkan saran dan kritik untuk kesempurnaan tesis ini.

Akhir kata, kami mohon maaf atas segala kesalahan dan kekhilafan, sengaja maupun tidak sengaja baik itu perkataan atau perbuatan yang kami lakukan selama kami menyelesaikan tesis ini.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Angka mortalitas yang masih tinggi menyebabkan sepsis sebagai masalah kesehatan dunia. Sepsis menimbulkan angka kematian yang cukup tinggi hampir di semua ICU. Di USA lebih dari 500.000 penderita tiap tahun terus meningkat serta menyebabkan lebih dari 175.000 pasien meninggal tiap tahunnya. Diperkirakan 750.000 orang menderita sepsis berat di Eropa dengan angka kematian sekitar 30% sampai 35%. Syok sepsis dan kegagalan multiorgan menghasilkan *outcome* yang buruk. Patofisiologi syok septik sudah banyak diketahui tetapi terapi masih terbatas dan mortalitas pasien syok masih tinggi. Dari data-data penelitian terapi inovatif dan *clinical trial* belum menghasilkan perbaikan yang signifikan dalam 40 tahun terakhir.^{1,2}

Penyebab terbesar sepsis adalah bakteri Gram negatif dengan prosentase hampir 60%. Di USA sekitar 20-60% angka kejadian bakteriemia disebabkan oleh bakteri gram negatif dan rata-rata 20% berkembang menjadi sepsis dengan angka kematian 40% tiap tahunnya. Bakteri Gram negatif akan menghasilkan produk yang dapat menstimulasi sel imun. Sel tersebut akan terpacu untuk melepaskan mediator inflamasi. Produk yang berperan besar terhadap sepsis adalah lipopolisakarida. Lipopolisakarida (LPS) atau endotoksin glikoprotein kompleks adalah komponen utama membran terluar dari bakteri gram negatif yang merupakan salah satu faktor patogenik pada sepsis dan dinyatakan sebagai penyebab sepsis terbanyak.^{3,4}

Respons sistemik terhadap sepsis akibat LPS akan menyebabkan aktivasi NF- κ B sebagai salah satu protein faktor transkripsi pada makrofag yang akan meningkatkan produksi mediator-mediator inflamasi atau sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor* (TNF- α), *interleukin* (IL- β) serta *interferon gamma* (IFN- γ). Peningkatan mediator inflamasi ini akan meningkatkan ekspresi *nitric oxide* (NO) dalam jumlah besar melalui aktivasi iNOS. iNOS diespresikan oleh sejumlah tipe sel imun terutama makrofag.⁵

Nitric oxide (NO) merupakan suatu molekul biologi yang terdapat di seluruh tubuh, dihasilkan oleh sejumlah tipe sel yang berhubungan dengan luasnya proses penyakit akan memberikan efek merugikan dan menguntungkan di tingkat seluler dan vaskuler. Pada kondisi sepsis NO mempunyai kontribusi yang sangat penting, dimana NO akan diproduksi dalam jumlah yang besar oleh iNOS yang terdapat pada makrofag, sel hepar maupun pada endotel pembuluh darah. Produksi NO yang meningkat pada sepsis menyebabkan perubahan fungsi kardiovaskuler seperti terjadinya hipotensi sistemik akibat hipokontraktilitas pembuluh darah serta depresi otot jantung, sehingga terjadi kegagalan sirkulasi yang mengarah pada kegagalan organ atau disebut juga *multiple organ system failure* (MOSF).^{6,7}

Pengelolaan anestesi pada pasien sepsis merupakan suatu hal yang sangat penting apabila tindakan operatif merupakan salah satu upaya dalam mengatasi sumber infeksi yang menyebabkan terjadinya sepsis. Ketamin suatu antagonis dari reseptor *N-methyl-D-aspartat*, sering digunakan karena mempunyai efek sedasi dan analgesi kuat. Ketamin adalah obat anestesi yang mempunyai efek stimulasi terhadap kardiovaskuler,

meningkatkan *cardiac output* dan *systemic vaskuler resistance* melalui stimulasi pada system saraf simpatis, menghasilkan pelepasan dari katekolamin.¹⁰

Pada penelitian ini paparan LPS dilakukan terhadap mencit dengan penyuntikan intraperitoneal, karena pada intraperitoneal terdapat banyak makrofag yang merupakan tipe sel spesifik untuk iNOS yang dipicu oleh LPS. Kadar NO diperiksa karena mempunyai efek langsung terhadap kondisi sepsis dibandingkan iNOS, lebih mudah untuk diperiksa dan lebih stabil. Dosis ketamin yang diberikan sesuai dengan dosis analgesi dan induksi.^{11,12}

Ketamin dalam bidang anestesi mempunyai beberapa dosis, antara lain dosis analgesia yang biasanya digunakan 0,25-0,5 mg/kgBB dan dosis induksi sebesar 1-2 mg/kgBB. Pada penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian ketamin terhadap kadar NO pada mencit digunakan dosis bertingkat yaitu 0,5 mg/kgBB, 1 mg/kgBB dan 2 mg/kgBB yang kemudian dikonversikan ke dalam dosis mencit menjadi 0,1 mg, 0,2 mg dan 0,4 mg mencit.

Daniele dkk (2004) dalam penelitiannya menemukan ketamin dalam kadar 3,6 dan 36 μM menekan kadar TNF- α dan IL-6 lebih besar dibandingkan dengan pemberian ketamin dengan kadar 18 μM (didapatkan dengan pemberian ketamin 2,2 mg/kgBB). Kawasaki dkk (1999) ketamin konsentrasi kurang dari 20 μM tidak menekan produksi TNF- α , IL-6 dan IL-8 secara signifikan secara *invitro*. Yuan dkk (2001) melaporkan bahwa ketamin konsentrasi 1-10 μM tidak berpengaruh terhadap produksi iNOS dan NO makrofag alveoli yang diberi endotoksin. Penelitian lain, Shimaoka dkk (1996) menyebutkan ketamin 150 μM secara signifikan menekan produksi sitokin proinflamasi dan NO pada kultur makrofag yang telah diberi

endotoksin.^{9,11,12}

1.2. Rumusan masalah

Apakah ketamin 0,1, 0,2 dan 0,4 mg intravena akan menurunkan kadar NO makrofag intraperitoneal pada mencit yang disuntik LPS intraperitoneal?

1.3. Tujuan penelitian

1.3.1. Tujuan umum:

Membuktikan efek ketamin 0,1, 0,2 dan 0,4 mg intravena pada mencit yang diberi LPS intraperitoneal terhadap penurunan kadar NO makrofag intraperitoneal.

1.3.2. Tujuan khusus:

1. Menilai adanya perbedaan penurunan kadar NO makrofag intraperitoneal antara mencit yang diberi LPS dan mendapat ketamin 0,1, 0,2 dan 0,4 mg dengan yang tidak mendapat ketamin intravena.
2. Menganalisis terjadinya penurunan kadar NO makrofag pada mencit yang diberi LPS dan ketamin intravena.

1.4. Manfaat penelitian

1. Mengetahui efektifitas pemberian ketamin pada kondisi sepsis dalam berbagai dosis.

2. Sebagai sumbangan teori dalam upaya menerangkan pengaruh pemberian ketamin terhadap kejadian SIRS/sepsis.
3. Penelitian ini dapat menjadi landasan untuk penelitian lebih lanjut.

1.5 Originalitas

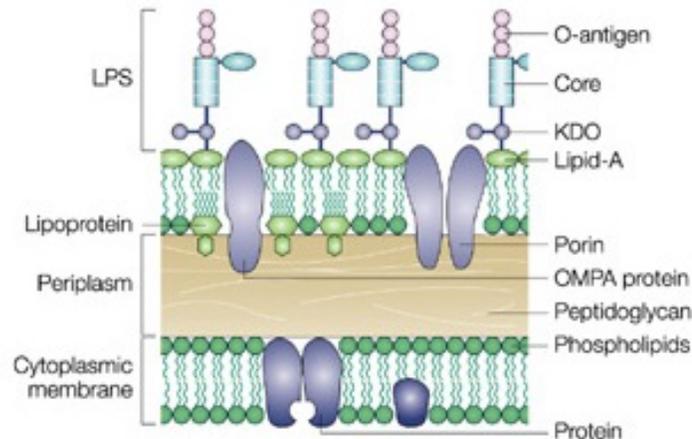
Peneliti	Variabel	Hasil
Daniele dkk (2004) Belanda	Konsentrasi TNF- α dan IL-6	Ketamin 3,6 μ M dan 36 μ M menekan kadar TNF- α dan IL-6 lebih besar dibandingkan pemberian ketamin dengan kadar 18 μ M (setara pemberian 2,2 mg/kgBB) secara <i>invitro</i> . ⁹
Kawasaki dkk (2001) Jepang	Konsentrasi TNF- α , IL-6 dan IL-8	Ketamin konsentrasi 10-50 μ M tidak menekan produksi TNF- α , IL-6 dan IL-8 secara signifikan secara <i>invitro</i> . ¹²
Yuan dkk (2001) Jepang	Kadar NO	Ketamin konsentrasi 1-10 μ M tidak berpengaruh terhadap produksi iNOS dan NO makrofag alveoli mencit yang diberi LPS secara <i>invitro</i> . ¹¹
Shimaoka dkk (1996) Jepang	Kadar NO	Ketamin 150 μ M secara signifikan menekan produksi sitokin proinflamasi dan NO pada kultur makrofag pada tikus yang diberi endotoksin. ¹⁰

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Lipopolisakarida

Endotoksin ialah *lipopolysaccharide* (LPS) yang terdapat di membran luar bakteri Gram negatif. Komposisi endotoksin terdiri atas rantai polisakarida (rantai O), yang di berbagai spesies bervariasi dan tidak toksik melapisi luar membran. Pemberian injeksi endotoksin murni atau lipid pada hewan coba dapat menimbulkan gejala syok sepsis. Beberapa mediator pejamu secara tidak langsung menyebabkan sepsis, endotoksin bakteri gram negatif mengikat larutan *LPS-binding protein* atau membran luar sel mononukleus. Pengaruh interaksi antara monosit, makrofag dan neutrofil melepas mediator inflamasi seperti interleukin (IL), interferon (IF), *platelet activating factor* (PAF), dan *tumor necrosis factor*.¹⁴

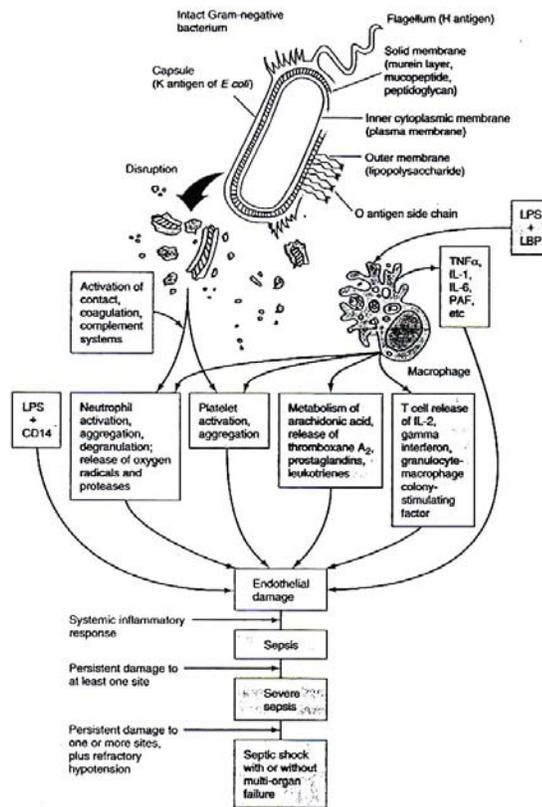


Gambar 1. Komponen membran luar gram negatif (LPS)
Dikutip dari <http://textbookofbacteriology.net/structure.html>

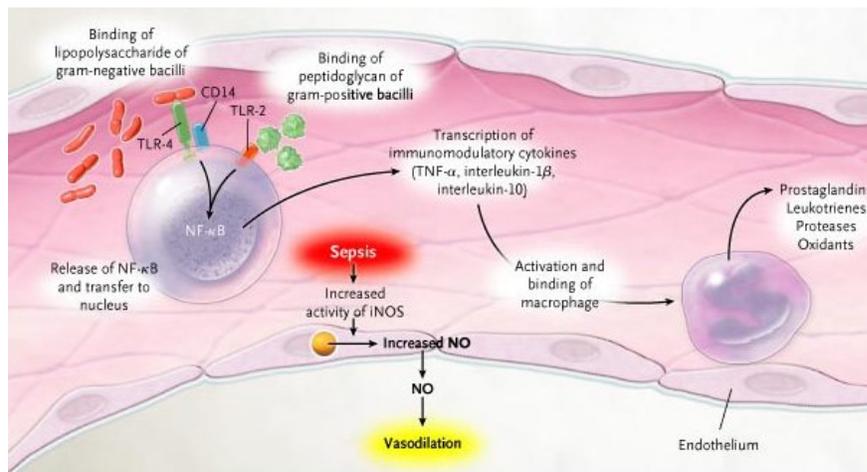
Toleransi terhadap endotoksin terjadi setelah pemberian berulang dosis kecil pada binatang dan ditandai oleh penurunan efek terhadap endotoksin dosis tinggi. Mekanisme dasar toleransi endotoksin kurang dimengerti tetapi toleransi endotoksin terjadi melalui dua fase. Toleransi fase awal terjadi dalam beberapa jam setelah terpapar endotoksin dan mekanismenya belum jelas. Toleransi fase lambat terjadi beberapa minggu setelah paparan awal terhadap endotoksin dan dihubungkan dengan produksi antigen-antibodi endotoksin.^{14,15}

2.1.1. Hubungan LPS dengan produksi sitokin

Lipopolisakarida (LPS) merupakan faktor patogenik utama pada sepsis gram-negatif, yang ditandai dengan syok, koagulopati, dan disfungsi multiorgan. Respons terhadap paparan LPS sistemik menyebabkan produksi sitokin proinflamasi seperti *tumor necrosis factor (TNF)- α* , interleukin (IL)-1 β , dan interferon- γ oleh *host*. Produksi sitokin proinflamasi dan induksi mediator seluler yang lebih distal seperti *nitric oxide*, *platelet activation factor (PAF)*, dan prostaglandin menyebabkan hipotensi, perfusi organ inadekuat, dan kematian sel yang berhubungan dengan MODS. Status proinflamasi ini didefinisikan sebagai *systemic inflammatory response syndrome (SIRS)*. Induksi sistem imunitas *innate* secara besar-besaran ini dapat dan seringkali menimbulkan efek katastrofik pada pasien dengan sindroma sepsis.^{1,6,15}



Gambar 2. Respons terhadap paparan LPS sistemik
 Dikutip dari Lorente AJ, Landin L, Esteban A.²¹



Gambar 3. Mekanisme terjadinya sepsis oleh karena LPS
 Dikutip dari Jonathan Cohen.²¹

2.2. Nitric oxide (NO)

Nitric oxide merupakan suatu molekul biologi yang di produksi oleh berbagai macam tipe sel akibat implikasi lebih lanjut dari suatu proses penyakit yang mempunyai efek menguntungkan dan dapat juga merugikan di tingkat seluler dan vaskuler.⁸

Endotelium merupakan suatu organ endokrin yang mampu mengatur fungsi mikrosirkulasi. Hasil yang terpenting adalah NO, yang merupakan vasodilator endogen. Efek utamanya adalah vasodilatasi lokal dan inhibisi agregasi trombosit. NO merupakan *endothelium-derived relaxing factors* (EDRFs) terpenting yang terbentuk dari transformasi asam amino L-arginin menjadi sitrulin melalui jalur *L-arginine-nitric oxide* dengan bantuan enzim NO sintase (NOS) yang diperantarai oleh cGMP. NO diproduksi atas pengaruh asetilkolin, bradikinin, serotonin, dan bertindak sebagai reseptor endotel spesifik. NOS diaktivasi oleh adanya robekan pada pembuluh darah dan estrogen, sebaliknya aktivasi NOS dihambat oleh asam amino dalam sirkulasi dan oleh ADMA (*asymmetrical dimethylarginine*).¹⁶

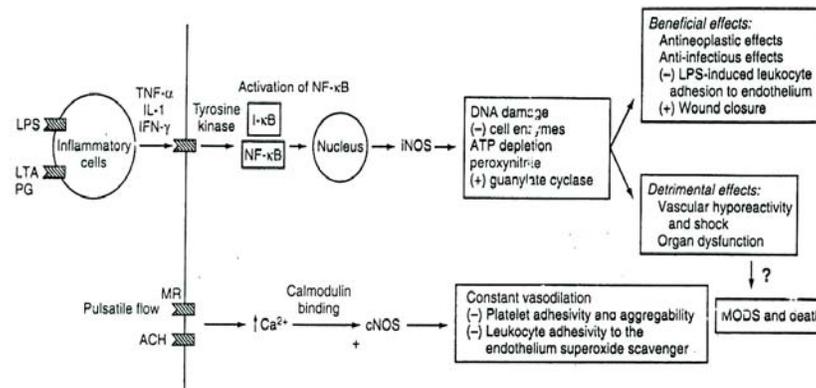
Enzim NO sintase terdiri dari beberapa famili yaitu yang termasuk *calcium dependent* (*constitutive* NOS(cNOS), didalamnya termasuk *neuronal* NOS (nNOS) dan *endothelial* NOS (eNOS)) dan *calcium independent* (*inducible isoform* NOS (iNOS)). nNOS berfungsi sebagai neurotransmitter yang berperan dalam pengaturan sistem autonom pada sistem kardiovaskuler, terdapat di ginjal, otot rangka, miokard dan pankreas. eNOS bekerja lokal pada endotel pembuluh darah untuk mengatur tekanan darah dan beberapa ditemukan pada sel imun.¹⁷

Pada beberapa penelitian terbaru didapatkan NOS yang berasal dari

mitokondria yang disebut sebagai *mitochondrial NOS* (mtNOS). mtNOS termasuk bagian *constitutive* NOS yang ekspresi dan aktivasinya juga dapat dipengaruhi oleh kondisi endotoksemia yang menyebabkan terjadinya gangguan pada fungsi mitokondria. Pada kondisi sepsis, aktivasi 66% mtNOS merupakan *calcium independent*. Peningkatan NO mitokondria akibat aktivasi mtNOS akan menyebabkan gangguan fungsi dan kerusakan dari mitokondria.¹⁷

iNOS pada kondisi normal biasanya tidak aktif, meskipun kadang dapat ditemukan pada beberapa sel. iNOS diekspresikan pada sel imun, eritrosit, otot polos pembuluh darah, ginjal, pankreas dan paru-paru. Aktivasi iNOS diakibatkan oleh adanya agen proinflamasi yang spesifik seperti endotoksin, *tumor necrosis factor* (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), dan interferon- γ (IFN- γ). Proses transkripsi dari *messenger ribonucleic acid* (mRNA) mempunyai peranan dalam mengaktivasi iNOS pada manusia, mRNA akan berikatan dengan faktor transkripsi seperti *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) dan *IFN-regulatory factors-1* (IRF-1).^{17,18}

Aktivasi iNOS akan menyebabkan terbentuknya NO dalam jumlah yang besar dan menunjukkan bahwa *L-arginine* tersedia dalam jumlah yang cukup. NO merupakan radikal bebas yang dapat disimpan dalam bentuk senyawa *nitrosothiol* yang lebih stabil tetapi tetap mempunyai kemampuan seperti NO. NO akan berikatan dengan *heme* yang mengandung protein seperti *guanylate cyclase* (GC) dimana hal tersebut akan menyebabkan pelepasan *3'5'-cyclic monophosphate* (cGMP). cGMP menjadi mediator relaksasi otot polos pembuluh darah serta otot jantung dan menghambat agregasi platelet.¹⁹



Gambar 4. Paparan LPS terhadap NO
 Dikutip dari Lorente AJ, Landin L, Esteban A.²⁰

Tabel 1. Klasifikasi *nitric oxide synthase* (NOS)

Dikutip dari Lorente AJ, Landin L, Esteban A.²⁰

	<i>nNOS (type I)</i>	<i>iNOS (type II)</i>	<i>eNOS (type III)</i>
<i>Cell type</i>	<i>Neural tissue</i>	<i>Macrophage, leukocytes, vascular smooth muscle cells, neurons, etc.</i>	<i>Endothelium</i>
<i>Calcium, calmodulin</i>	<i>Dependent</i>	<i>Independent</i>	<i>Dependent</i>
<i>Inducibility</i>	<i>Constitutive</i>	<i>Inducible</i>	<i>Constitutive</i>
<i>Activators</i>	<i>Excitatory amino acid such as glutamate and NMDA</i>	<i>Cytokines, bacterial lipopolysaccharides</i>	<i>Acetylcholine, ADP, bradykinin, thrombin, serotonin, stretch</i>
<i>Release</i>	<i>Transient release of minute quantities (picomoles) of NO</i>	<i>Sustained release of large amount (nanomoles) of NO</i>	<i>Transient release of minute quantities (picomoles) of NO</i>
<i>Main physiologic function</i>	<i>Neurotransmission, neuroprotection</i>	<i>Cytotoxicity effects toward tumor cells and invading tumor cells and invading microorganisms after immunologic stimulation</i>	<i>Maintenance of a microvascular blood flow and inhibition of adhesion and activation of circulating blood cells</i>

Produksi NO melalui iNOS memiliki peranan penting dalam patogenesis syok septik. Sel pejamu merespons LPS dan sitokin dengan mengeluarkan berbagai sitokin proinflamasi dan terjadi peningkatan ekspresi iNOS yang menghasilkan kuantitas besar NO. Produksi NO pada paru dan hepar menyebabkan hipotensi sistemik dan depresi miokard yang merupakan ciri khas syok septik.^{8,19,20}

2.2.1. Peran NO dalam sepsis

Pada keadaan sepsis sejumlah sel akan teraktivasi oleh karena agen proinflamatory yang spesifik seperti endotoksin, TNF- α , IFN- γ dan IL-1 akan menginduksi aktifnya *isoform calcium-independent NOS*. Ekspresi iNOS yang meningkat akibat terpapar oleh endotoksin memicu produksi sitokin inflamasi oleh sel pertahanan tubuh, paling banyak pada sel makrofag. Endotoksin akan menyebabkan makrofag memproduksi bermacam-macam sitokin, salah satunya adalah IL-12, dimana IL-12 akan mengaktifkan sel *natural killer* (NK) untuk memproduksi IFN- γ . IFN- γ ini akan meningkatkan proliferasi dan aktivasi dari makrofag dalam melakukan fagositosis. Enzim fagositosis pada makrofag antara lain adalah phagocyte oxidase dan iNOS.¹⁴

Aktivasi iNOS selama respons inflamasi sebagian besar diregulasi pada tingkat transkripsi, meski dapat juga terjadi pada tingkat post transkripsi dan post translasi. Sejumlah faktor transkripsi, seperti *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B), *IFN-regulatory factor-1* (IRF-1), *signal transducer and activator of transcription* (Stat1 α), dan Oct-1, diinduksi dan diaktivasi oleh LPS dan sitokin, berperan sebagai promotor

gen iNOS untuk mengaktivasi transkripsi.¹⁵

NF- κ B yang merupakan suatu protein faktor transkripsi yang terdapat pada makrofag akan teraktivasi akibat toksin dari bakteri seperti LPS. Proses ini akan menyebabkan peningkatan mediator proinflamasi seperti IL-8, TNF- α , *intercellular adhesion molecul*, serta *cyclooxygenase-2*. Disisi lain NF- κ B juga dapat diaktivasi oleh *innate immunity* seperti IL-1, IL-18 dan TNF- α .¹⁴

Tingginya kadar *nitric oxide* (NO) yang diproduksi oleh iNOS dapat berfungsi sebagai bakterisidal dan juga efek anti-apoptosis. iNOS dapat terinduksi dalam dinding pembuluh darah oleh sitokin dan oleh endotoksin lipopolisakarida, yang bekerja melalui pelepasan sitokin. Hal ini terjadi baik pada endotel maupun sel otot polos, yang menyebabkan relaksasi vaskuler yang resisten terhadap obat-obat vasokonstriktor dan dapat dicegah dengan terapi glukokortikoid dan NOS inhibitor. Syok endotoksin pada binatang terjadi peningkatan jumlah *nitric oxide* secara langsung berhubungan dengan derajat hipotensi. Pelepasan *nitric oxide* oleh enzim iNOS sebanding dengan vasodilatasi dan resisten terhadap vasokonstiktor menjadi gejala khas pada syok septik.^{14,16}

Fungsi dari cNOS pada sepsis belum pernah diterangkan secara jelas. Beberapa penelitian eksperimental menggambarkan bahwa dengan penurunan aktivitas cNOS berpengaruh dalam relaksasi endotel secara langsung dalam kondisi endotoksemia dan sepsis, hal tersebut kemungkinan diakibatkan oleh adanya sitokin, hipoksia yang menyebabkan waktu paruh cNOS mRNA yang berkurang atau dikarenakan perubahan mobilisasi calcium. Dari penelitian yang lain didapatkan peningkatan NO endotel secara langsung sesaat setelah pemberian endotoksin. Pada

sepsis aktivitas NO endotel kadangkala meningkat pada awalnya dan menurun beberapa saat kemudian. Beberapa penelitian yang lain juga menunjukkan peningkatan *constitutive* NO oleh endotel dan aktivasi dari enzim iNOS.¹⁷

Pada sepsis, kejadian yang kompleks dapat menyebabkan terjadinya proses apoptosis sehingga mengakibatkan kegagalan multiorgan sebagai respons adaptif seluler. Radiasi ultraviolet, asap rokok, ozon, lipopolisakarida dapat mengaktivasi NF- κ B untuk terjadinya apoptosis. NF- κ B merupakan faktor transkripsi sensitif stress oksidasi yang mengatur ekspresi bermacam-macam gen penting dalam respons seluler, termasuk inflamasi, imunitas *innate* dan pertumbuhan. Antioksidan dapat melemahkan efek paparan dari lipopolisakarida dan memblokir produksi NF- κ B.^{10,14}

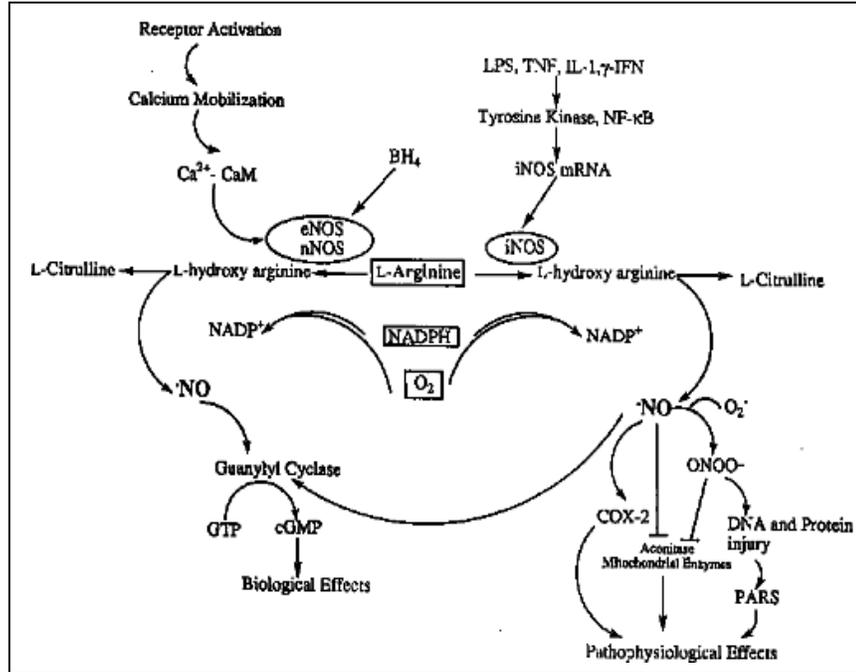
NO memegang peranan penting dalam kerusakan sel, baik untuk sitostatik maupun sitotoksik yang tidak hanya untuk menyerang mikroorganisme tetapi juga untuk sel yang memproduksi dan untuk sel di sekitarnya. Didapatkan laporan bahwa inhibitor NOS maupun donor NOS bermanfaat dalam melawan beberapa bentuk penyakit. Hal ini mungkin sesuai dengan dualisme NO, di mana pada satu sisi sebagai sitotoksik dan pada sisi lain merupakan vasodilator dan juga berpotensi sebagai proteksi. NO berperan ganda dalam reaksi inflamasi, dari penyebab vasodilatasi dan edema, sampai pada sitotoksik terhadap jaringan melalui modulasi aktivitas ujung saraf sensorik dan leukosit.¹⁸

Inhibitor iNOS dapat mencegah dan memperbaiki hipotensi pada binatang yang disebabkan LPS. Pada pasien dengan syok septik, dosis rendah *N-monomethyl L-arginine*, ditambahkan dalam terapi standar, akan memperbaiki kondisi hipotensi ini. Percobaan pada binatang membuktikan bahwa derajat inhibisi NOS merupakan hal

penting bagi *outcome* terapi, tetapi pada dosis besar akan mengakibatkan vasokonstriksi, kerusakan *end-organ*, dan mempercepat kematian. Hasil ini tidak mengejutkan pada kondisi seperti syok septik, dimana hipotensi tetap terjadi dalam kondisi saat kadar vasokonstriktor dalam darah meningkat. Salah satu solusi masalah ini mungkin dengan menghambat generasi *endogenous NO* secara menyeluruh dan pada saat yang sama vasodilator nitrat digunakan untuk menghilangkan efek hipertensi sehingga keadaan hemostasis tetap terjaga.^{5,19}

2.2.2. Hubungan produksi NO dengan LPS

Endotoksin menginduksi ekspresi *Ca-independent (inducible) isoform* dari NOS (iNOS) dalam makrofag, sel otot polos vaskuler, fibroblas, hepatosit, sel Kupffer, keratonosit, dan megakariosit secara *in vitro* dan dalam sejumlah jaringan termasuk paru, lien, hepar, jantung, ginjal, dan juga pembuluh darah secara *in vivo*. Pembentukan NO dalam jumlah besar pada endotoksemia menjadi hal penting dalam kunci pengobatan syok septik pada masa yang akan datang, seperti hipotensi, hiporeaktifitas vaskuler terhadap obat-obat vasokonstriktor, disfungsi miokardium.^{15,17,18}



Gambar 7. Efek endotoksin terhadap NO
 Dikutip dari Lorente AJ, Landin L, Esteban A.²¹

Endotoksin memacu NOS dalam otot polos vena, miokardium dan endokardium, memperbanyak sintesis NO oleh NOS yang mungkin berkontribusi terhadap *venous pooling* dan disfungsi jantung yang berhubungan dengan endotoksemia dan induksi oleh NOS. Pada pembuluh darah jantung, NO mempunyai peran fisiologi jika disebabkan oleh komponen enzim yang secara normal terdapat pada otot jantung dan mungkin menjadi patologik sehingga menyebabkan dilatasi dan kerusakan jaringan jika NO dalam jumlah besar dan periode yang lama.^{18,19}

2.3. Ketamin

Ketamin telah dikenal lebih dari 30 tahun, namun baru dalam beberapa tahun belakangan dapat diterima secara luas dalam praktek anastesi. Ketamin ditemukan oleh Steven dari Detroit dan dicobakan pada sukarelawan di penjara Michican pada tahun 1964. Ketamin mulai digunakan untuk anastesi pada tahun 1965 oleh Domino dan Corssen.^{22,23}

Ketamin atau *2-0-chlorophenyl-2-methylaminocyclohexanone hydrochloride* adalah derivat *phencyclidine*, yang menimbulkan “*dissociative anesthesia*,” yang ditandai oleh bukti pada electroencephalogram (EEG) tentang disosiasi antara talamokortikal dan sistem limbik. Anestesi disosiasi menyerupai suatu keadaan kataleptik di mana mata membuka dengan suatu tatapan nistagmus lambat, pasien tidak komunikatif, walaupun nampak seperti sadar, terjadi berbagai derajat gerakan otot skelet hipertonus yang sering terjadi tanpa tergantung dari stimulasi bedah dan pasien tersebut mengalami amnesia serta analgesi yang kuat.²³

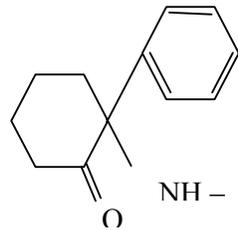
Ketamin telah terbukti dapat dipakai pada berbagai kasus gawat darurat dan dianjurkan untuk pasien dengan sepsis atau pasien dengan sakit parah, hal ini karena efek stimulasi ketamin terhadap kardiovaskuler. Ketamin akan meningkatkan *cardiac output* dan *systemic vascular resistance* lewat stimulasi pada system saraf simpatis akibat pelepasan katekolamin.²¹

Penggunaan ketamin dalam anesthesia sangat bervariasi. Ketamin dapat digunakan untuk premedikasi, sedasi, induksi dan rumatan anastesi umum. Selain itu penderita dengan risiko tinggi gangguan respirasi dan hemodinamik

merupakan indikasi penggunaan ketamin. Hal ini oleh karena beberapa sifat ketamin seperti indeks terapeutik yang tinggi, mempertahankan fungsi kardiovaskuler, kecukupan ventilasi spontan dan tetap utuhnya reflek-reflek laryngeal dan faringeal.²¹

2.3.1 Hubungan aktivitas struktur ketamin

Ketamin adalah suatu molekul dapat larut dalam air yang dari sudut bangunannya menyerupai *phencyclidine*, adanya suatu atom karbon yang tidak simetris mengakibatkan keberadaan dua isomer optis ketamin, yaitu isomer S (+) dan R (-). Hanya campuran yang *racemic* berisi sejumlah sama dua ketamin isometri yang tersedia untuk penggunaan secara klinis. Ketika dipelajari secara terpisah, isometri yang positif (S) menghasilkan (1) analgesia yang lebih baik, (2) kesadaran lebih cepat, dan (3) lebih rendahnya insiden reaksi terbangun dibandingkan isomer negatif.(R). Kedua isometri ketamin mampu menghalangi pengambilan kembali katekolamin ke saraf simpatik postganglion (suatu efek seperti kokain). Pada percobaan secara *in vivo* ditunjukkan bahwa isomer S (+) ketamin 2 – 3 kali lebih poten dari pada isomer R (-) ketamin dalam analgesia. Pada faktanya bahwa isomer optis ketamin oleh para ahli farmakologis dinyatakan bahwa obat ini saling berhubungan dengan rangsangan yang spesifik²²



Gambar 7. Rumus bangun ketamin
Dikutip dari Stoelting, Hiller.²²

2.3.2 Mekanisme kerja ketamin

Ketamin adalah suatu obat penghilang sakit kuat pada konsentrasi plasma subanestetik, dan efek anestetik dan analgesia mungkin diperantarai oleh mekanisme yang berbeda. Yang secara rinci, analgesia mungkin dalam kaitan dengan suatu interaksi antara ketamin dan reseptor opioid di dalam sistem saraf pusat. Ketamin dan campuran seperti *phencyclidin* telah memperlihatkan blok nonkompetitif eksitasi neural induksi dengan asam *amin N-methyl-D-aspartate* (NMDA).²¹

Ketamin dapat menyebabkan peningkatan tekanan darah sistolik dan diastolik yang ringan. Efek terhadap kardiovaskuler adalah peningkatan tekanan darah arteri paru dan sistemik, laju jantung dan kebutuhan oksigen jantung. Ketamin dapat pula meningkatkan isi semenit jantung pada menit ke 5 – 15 sejak induksi. *Cardiac index* (CI) akan meningkat dari 3,1 liter/menit/m² menjadi 3,5 liter/menit/m². Ketamin tidak menyebabkan pengeluaran histamin.²²

Ketamin dilaporkan berinteraksi dengan mu (μ), delta (δ) dan kappa (κ) reseptor dari opioid. Interaksi dengan opioid reseptor ini pada berbagai studi menduga bahwa ketamin sebagai antagonis pada μ reseptor dan agonis pada κ reseptor¹.

N-methyl-D-aspartate adalah suatu asam amino yang bekerja sebagai reseptor dan merupakan subgrup dari reseptor opioid. Ketamin bekerja sebagai suatu reseptor antagonis untuk memblokir *spinal nociceptive reflex*⁶. Toleransi silang antara ketamin dan opioids suatu reseptor umum untuk induksi analgesia ketamin. Suatu opioid reseptor teori akan lebih lanjut didukung oleh pembalikan efek ketamin dengan *naloxone*. Sampai saat ini, pembahasan efek *naloxone* atau respons ketamin belum selesai^{1, 22}.

Dalam klinik dilaporkan ketamin tidak hanya digunakan dalam general anestesi tetapi juga regional anestesi. *Neuronal system* mungkin melibatkan kerja antinosiseptif dari ketamin, blokade norepinefrin dan serotonin reseptor merupakan kerja ketamin sebagai analgesia. Dari berbagai data menduga bahwa aksi antinosiseptif dari ketamin mungkin menghambat jalur monoaminergik pain. Ketamin juga saling berhubungan dengan reseptor kolinergik muskarinik dalam sistem saraf pusat, yang berpusat pada kerja agen antikolinesterase seperti *physostigmine* mungkin menjelaskan anestesi dari ketamin^{22,23}.

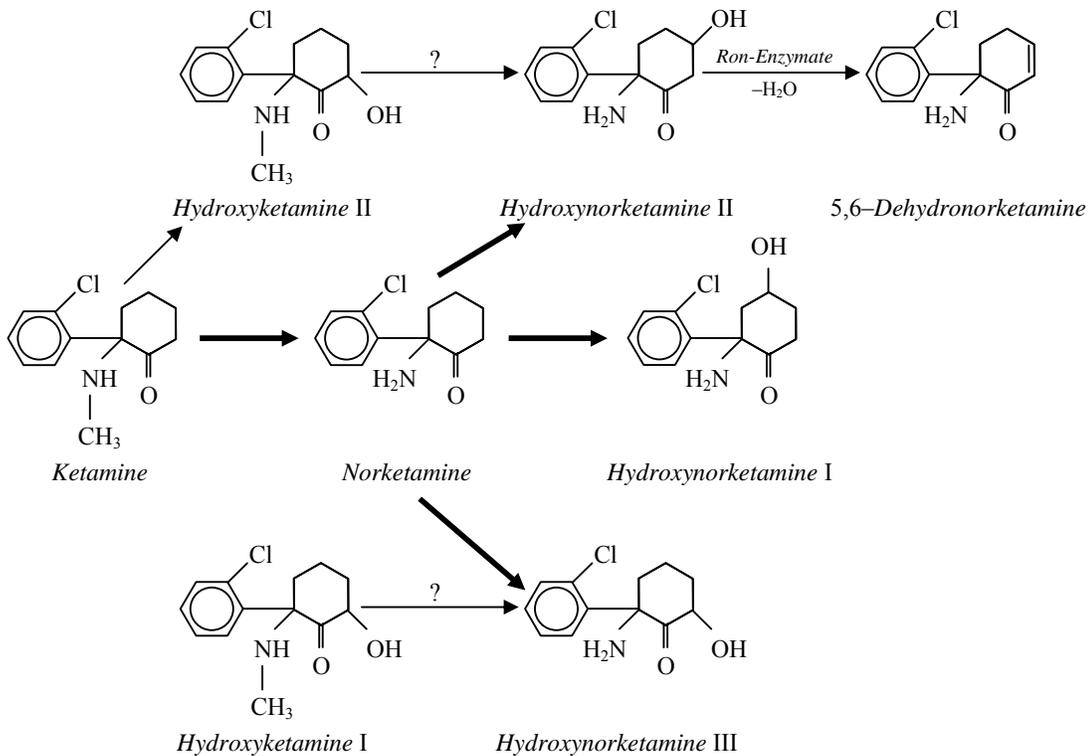
2.3.3 Farmakokinetik ketamin

Farmakokinetik ketamin menyerupai tiopental dalam onset yang cepat, durasi yang singkat, dan daya larut tinggi dalam lemak (Tabel 1-1). Ketamin mempunyai suatu pKa 7,5 pada pH fisiologis. Konsentrasi plasma puncak ketamin terjadi dalam 1 menit pada pemberian IV dan dalam 5 menit pada suntikan IM. Ketamin tidaklah harus signifikan menempel ke protein plasma dan meninggalkan darah dengan cepat dan didistribusikan ke dalam jaringan. Pada awalnya, ketamin didistribusikan ke jaringan yang perfusinya tinggi seperti otak, di mana puncak konsentrasi mungkin empat sampai lima kali di dalam plasma. Daya larut ketamin dalam lemak (5 – 10 kali dari tiopental) memastikan perpindahan yang cepat dalam sawar darah otak. Lagipula, induksi ketamin dapat meningkatkan tekanan darah cerebral bisa memudahkan penyerapan obat dan dengan demikian meningkatkan kecepatan tercapainya konsentrasi yang tinggi dalam otak. Sesudah itu, ketamin didistribusikan lagi dari otak dan jaringan lain yang perfusinya tinggi ke lebih sedikit jaringan yang perfusinya baik. Waktu paruh ketamin adalah 1 – 2 jam.²¹

Kegagalan fungsi ginjal atau enzim tidak mengubah durasi dari dosis tunggal ketamin yang mempengaruhi distribusi kembali obat dari otak ke lokasi jaringan non-aktif. Metabolisme hepar, seperti halnya dengan tiopental, adalah penting untuk bersihkan ketamin dari tubuh. Ketamin tersimpan dalam jaringan dimana dapat berperan pada efek kumulatif obat dengan pengulangan atau pemakaian yang kontinyu.²¹

2.3.4 Metabolisme ketamin

Metabolisme ketamin secara ekstensif oleh microsomal enzim hepatic. Suatu jalur metabolisme yang penting adalah demethylation ketamin oleh sitokrom P-450. Enzim dapat membentuk norketamin (gambar 2)³. Pada binatang percobaan, norketamin adalah seperlima sampai sepertiga sama kuat seperti ketamin. Metabolit yang aktif ini dapat berperan untuk ketamin yang diperpanjang. Norketamin adalah *hydroxylated* dan kemudian menghubungkan ke glucuronide metabolit yang non-aktif dan dapat larut dalam air. Pada pemberian secara intra vena (IV), kurang dari 4% dosis ketamin dapat ditemukan dalam air seni tanpa perubahan. *Fecal* kotoran badan meliputi kurang dari 5% dari dosis ketamin injeksi. Halotan atau diazepam memperlambat metabolisme dari ketamin dan memperpanjang efek obat tersebut.²¹



Gambar 8. Metabolisme ketamin
Dikutip dari Stoelting, Hiller.²²

2.3.5 Penggunaan klinis ketamin

Ketamin adalah suatu obat yang unik yang menimbulkan analgesia kuat pada dosis subanestetik dan memproduksi induksi anesthesia yang cepat melalui intra vena pada dosis lebih tinggi. Pemberian dari suatu *antisialogogue* dalam pengobatan preoperatif sering direkomendasikan untuk menghindari batuk dan laryngospasme oleh karena ketamin berhubungan dengan pengeluaran ludah. Glikopirolat mungkin lebih baik, seperti atropin atau skopolamin bisa secara teoritis meningkatkan timbulnya kegawatan delirium.²¹⁻²³

Analgesia kuat dapat dicapai dengan dosis ketamin subanestetik, 0,2 sampai 0,5 mg kg⁻¹ IV. Analgesia ditujukan lebih baik untuk nyeri somatik dibanding untuk nyeri viseral. Analgesia dapat dilakukan selama kehamilan tanpa berhubungan dengan depresi Neonatal. *Neonatal neurobehavioral score* bayi yang dilahirkan lewat pervaginal dengan ketamin analgesia adalah lebih rendah dari pada bayi mereka yang lahir dengan epidural atau spinal anesthesia, tetapi lebih tinggi dibanding skor bayi dengan tiopental-nitrous oksida.²³

Ketamin digunakan sebagai induksi anestesi dengan dosis, 1 – 2 mg kg⁻¹ IV atau 5 – 10 mg kg⁻¹ IM. Suntikan ketamin melalui intra vena tidak menimbulkan nyeri atau iritasi pembuluh darah. Kebutuhan untuk intramuskular dengan dosis besar mencerminkan suatu efek metabolisme di hepar yang signifikan untuk ketamin. Kesadaran hilang 30 sampai 60 detik setelah penggunaan intravena dan 2 sampai 4 menit setelah suntikan intramuscular. Kesadaran hilang dihubungkan dengan pemeliharaan normal atau hanya refleks berkenaan dengan depresi faringeal dan laringeal. Kembalinya kesadaran pada

umumnya terjadi 10 sampai 15 menit yang mengikuti suatu dosis induksi ketamin intravena, tetapi kesadaran yang komplit dapat tertunda lama. Amnesia dapat menetap untuk sekitar 1 jam setelah kembalinya kesadaran, tetapi ketamin tidak menyebabkan amnesia retrograd.²³

2.3.6 Efek ketamin pada sepsis dan mediator proinflamasi

Paparan LPS yang akan menyebabkan terjadinya sepsis digambarkan dengan adanya pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1 β , IL-8 yang berhubungan dengan kerusakan endotel dan jaringan. Efek paparan LPS menyebabkan pelepasan beberapa sitokin (TNF, NF- κ B, IL-1, IL-8, NO) sebagai pertahanan terhadap benda asing yang memiliki dampak positif dan negatif terhadap tubuh. Dampak yang timbul akibat pelepasan sitokin menyebabkan efek inflamasi.^{9,12,14}

Faktor transkripsi NF- κ B mempunyai peranan krusial pada proses inflamasi. Aktivasi NF- κ B dapat menuju kearah transkripsi dari protein-protein proinflamasi. Ketamin menghambat aktivasi NF- κ B melalui penekanan degradasi I κ B- α dan translokasi NF- κ B sehingga akan menghambat produksi sitokain proinflamasi . Ketamin mensupresi produksi LPS-*induced* TNF- α , IL-6 dan IL-8 dan rhTNF-*induced* IL-6 and IL-8 dalam darah manusia. TNF- α adalah sitokin pertama yang timbul setelah stimulasi LPS, yang kemudian menstimulasi sekresi IL-6 and IL-8 dari makrofag monosit, neutrofil, dan sel endotel . Supresi ketamin pada produksi LPS *induced* IL1, IL-6 and IL-8 disebabkan efek inhibisi ketamin pada produksi LPS-*induced* TNF- α .^{9,11,3}

2.3.7 Efek ketamin terhadap NO

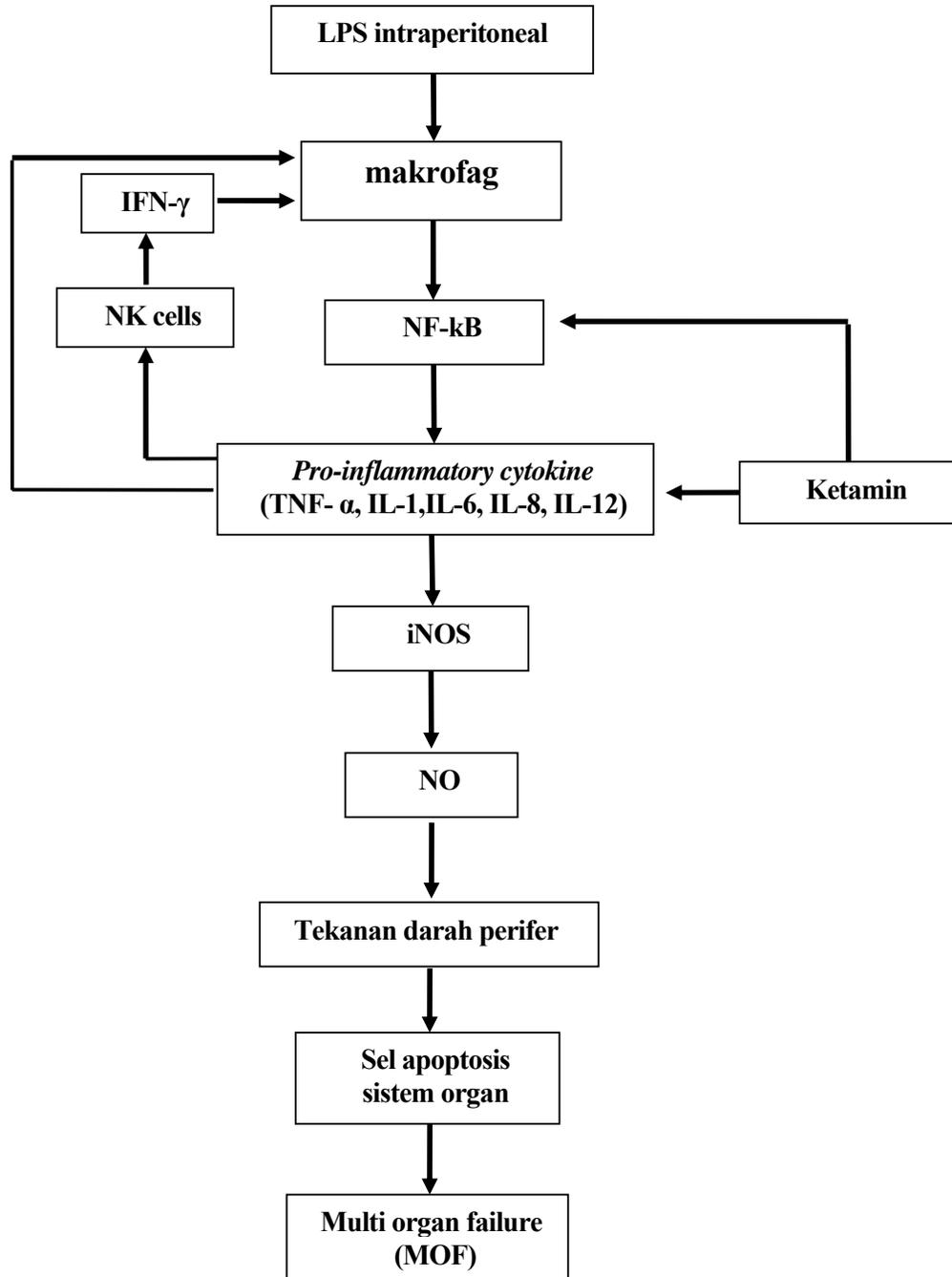
Aktivasi dari NMDA reseptor yang terdapat pada susunan saraf pusat akan menghasilkan sintesa NO oleh cNOS. Ketamin sebagai antagonis NMDA akan menghambat pelepasan NO pada sel otot polos pembuluh darah otak.^{9,11}

NO merupakan faktor kontribusi penting terhadap patogenesis sepsis. Rangsangan inflamasi seperti LPS, merangsang produksi NO oleh aktivasi iNOS. Pelepasan NO yang berlebihan akan menyebabkan vasodilatasi sistemik. Ketamin mempunyai efek sebagai immunosupresif melalui penekanan mediator proinflamasi dan aktifitas iNOS sehingga produksi NO dapat ditekan.¹²

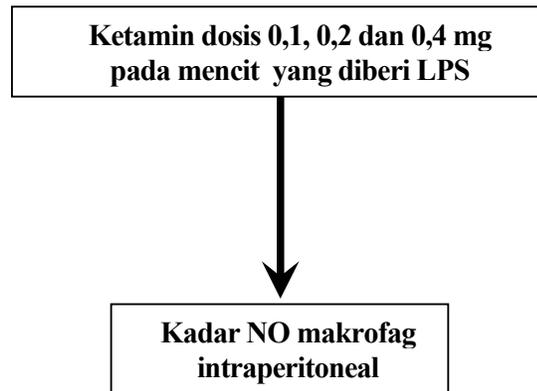
BAB 3

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka teori



3.2. Kerangka konsep



Pada penelitian ini Nf-kB dan iNOS tidak diperiksa dikarenakan cara pemeriksaan yang relatif sulit dan tidak stabil dikarenakan waktu paruh yang singkat. Pemeriksaan NO yang merupakan hasil dari suatu respon imun yang lebih distal dapat mewakili keduanya.

3.3. Hipotesis

Pemberian ketamin 0,1, 0,2 dan 0,4 mg/kgBB intravena akan menurunkan kadar NO makrofag intraperitoneal pada mencit yang diberi lipopolisakarida intraperitoneal.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan penelitian

Penelitian ini termasuk eksperimental murni uji praklinis dengan desain *randomized post test only controlled group* dengan tujuan mencari pengaruh pemberian ketamin intravena pada mencit yang diberi lipopolisakarida intraperitoneal terhadap kadar NO makrofag intraperitoneal.

Kelompok dibagi menjadi 4 yaitu kelompok kontrol (K1), Perlakuan 1 (K2), Perlakuan 2 (K3), Perlakuan 3 (K4). Pembagian kelompok perlakuan:

K1 : Kelompok kontrol , mencit yang disuntik LPS intraperitoneal dan mendapat NaCl 0,9% intravena

K2 : Kelompok perlakuan 1, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal dan mendapat Ketamin 0,5 mg/kgBB intravena

K3 : Kelompok perlakuan 2, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal dan mendapat Ketamin 1 mg/kgBB intravena

K4 : Kelompok perlakuan 3, mencit yang disuntik LPS intraperitoneal dan mendapat Ketamin 2 mg/kgBB intravena.

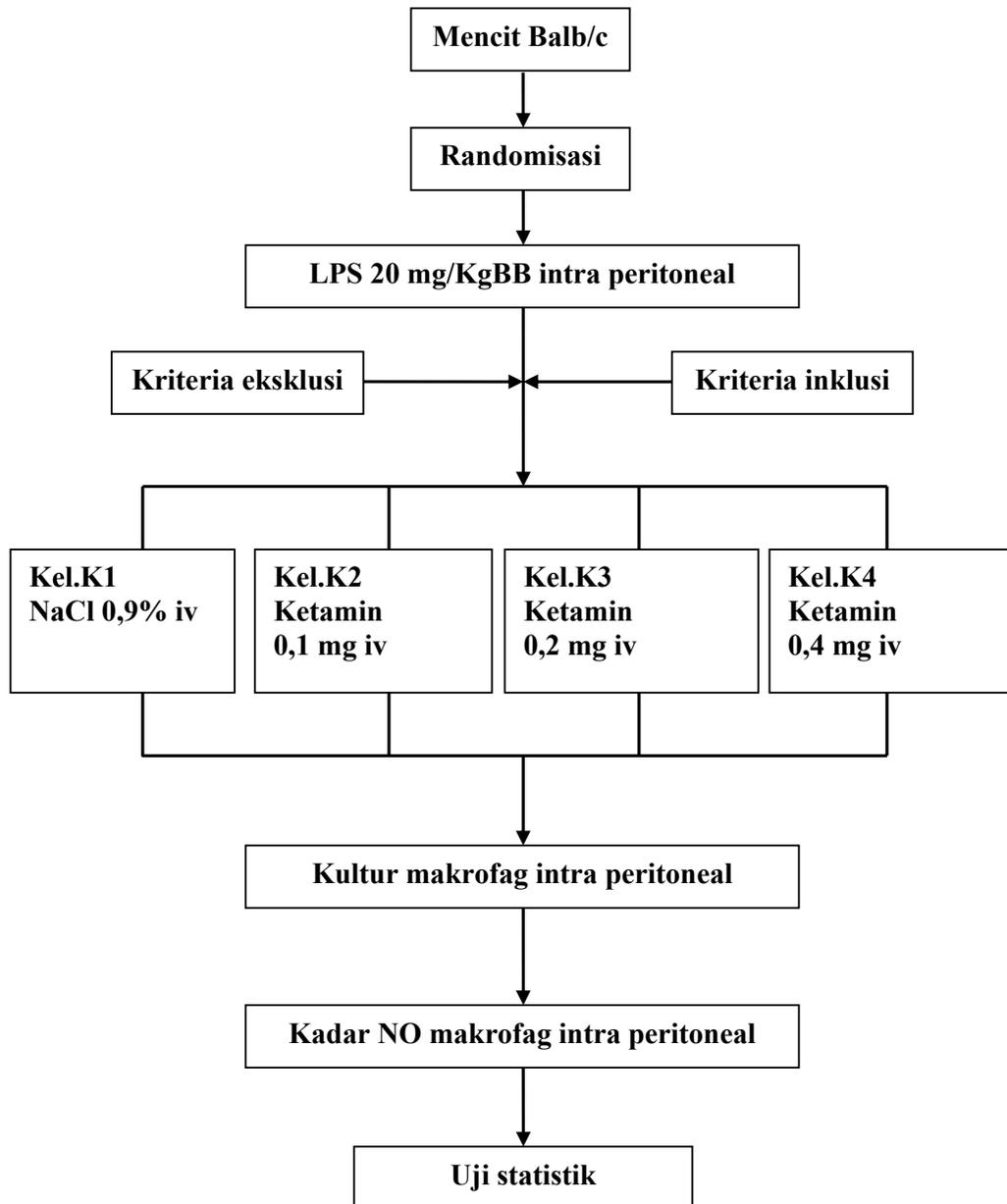
Dosis obat yang diberikan disetarakan dengan dosis pada manusia dengan berat badan 70 kg dikalikan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026. Jadi dosis yang diberikan pada masing-masing kelompok:

$$0,5 \text{ mg/kgBB} \rightarrow 0,5 \text{ mg/kgBB} \times 70 \text{ kg} \times 0,0026 = 0,1 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mg/kgBB} \rightarrow 1 \text{ mg/kgBB} \times 70 \text{ kg} \times 0,0026 = 0,2 \text{ mg}$$

$$2 \text{ mg/kgBB} \rightarrow 2 \text{ mg/kgBB} \times 70 \text{ kg} \times 0,0026 = 0,4 \text{ mg}$$

4.1.1 Skema alur penelitian



4.2. Ruang lingkup penelitian

4.2.1. Subyek penelitian

Populasi : Mencit jantan strain BALB/c

Sampel : Sampel diambil secara acak tersamar ganda yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi

4.2.2. Waktu dan tempat penelitian

Waktu penelitian : 30 hari

Tempat pemeliharaan dan penelitian :

Laboratorium biokimia FK UNDIP

Laboratorium Cebior FK UNDIP

LPPT Universitas Gajahmada

4.3. Kriteria inklusi dan eksklusi

4.3.1. Kriteria inklusi

Mencit Balb/c jantan.

Umur 8-10 minggu

Berat badan 20 - 30 gram

Tidak ada kelainan anatomis

Sehat dan aktif selama masa adaptasi

4.3.2. Kriteria eksklusi

Mencit sakit selama masa adaptasi 7 hari (gerakan tidak aktif).

Mati selama perlakuan berlangsung.

4.4. Randomisasi

Besar sampel sebanyak 20 mencit berdasarkan *Research Guidelines For Evaluation The safety and Efficacy of Herbal Medicines* dari WHO, kemudian sampel dikelompokkan secara random menjadi 4 kelompok yaitu:

Kelompok K1 : 5 mencit

Kelompok K2 : 5 mencit

Kelompok K3 : 5 mencit

Kelompok K4 : 5 mencit.

4.5. Variabel penelitian

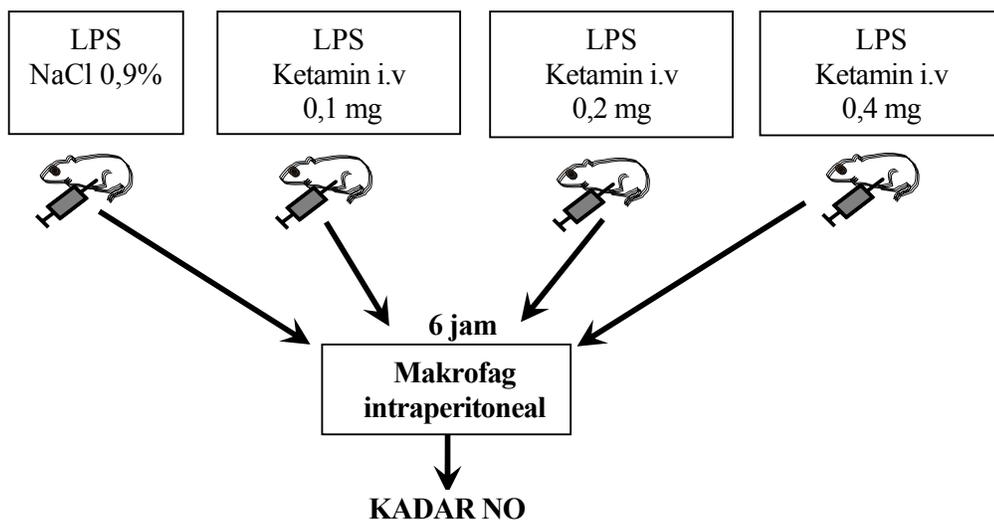
4.5.1. Variabel bebas

Pemberian ketamin

4.5.2. Variabel tergantung

Kadar NO makrofag intraperitoneal

4.6. Kerangka kerja penelitian



4.7. Definisi operasional

- Lipopolisakarida (LPS) atau endotoksin adalah suatu komponen membran luar dari bakteri Gram negatif yang berasal dari bakteri *E.coli* yang disuntikkan intraperitoneal pada mencit balb/C yang sensitif terhadap LPS dengan dosis 20 mg/kgBB.
- Ketamin atau *2-0-chlorophenyl-2-methylaminocyclohexanone hydrochloride* adalah derivat *phencyclidine* merupakan obat anestesi yang diberikan intravena dengan dosis 0,1 mg , 0,2 mg dan 0,4 mg.
- Kadar *nitric oxide* (NO) makrofag intraperitoneal adalah kadar NO makrofag intraperitoneal yang diukur dengan metode *Griess* dan dinyatakan dengan satuan $\mu\text{Mol/L}$.

4.8. Bahan, alat penelitian dan cara kerja

4.8.1. Bahan

1. *Chloroform*
2. Alkohol 70%
3. Asam asetat 3% + *crystal violet* 1mg/100 ml
4. *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 yang mengandung L-glutamin (1mM), *Fetal Bovine Serum* (FBS)5% dan antibiotik Penisillin 50 unit dan Streptomisin 50 $\mu\text{g/ml}$

4.8.2. Alat yang dibutuhkan

1. Gunting dan Pinset
2. Semprit 10 ml dengan jarum ukuran 18 atau 20 gauge
3. tabung sentrifuse 50 ml steril
4. pipet pasteur steril
5. tabung berlapis sikon
6. *hemacytometer*
7. *refrigerated centrifuge*

4.8.3. Cara pengambilan makrofag

1. Mencit dibunuh dengan dislokasi leher setelah dinarkose menggunakan kloroform, dibaringkan terlentang dan seluruh permukaan perut disiram dengan alkohol 70%
2. Buat irisan kecil pada kulit menggunakan gunting pada medial perut. Robek kulit menggunakan 2 pinset kearah kepala dan ekor mencit, sehingga kulit terkelupas dan tampak peritoneum. Basahi peritoneum dengan alkohol 70% untuk menyingkirkan bulu-bulu yang rontok.
3. Suntikkan 10 ml medium RPMI yang mengandung 2% FBS kedalam rongga peritoneum, tunggu 2 menit sambil ditekan-tekan secara perlahan.
4. Cairan peritoneal diaspirasi dari rongga peritoneum dengan cara

- menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan spuit injeksi. Aspirat yang didapat ditampung dalam tabung sentrifus.
5. Aspirat yang didapat kemudian disentrifus pada 400xg, 4°C selama 10 menit
 6. Supernatan dibuang, cuci 2X dengan RPMI yang mengandung 2%FBS
 7. Kemudian ditambahkan 2 ml medium RPMI 1640 yang mengandung L-glutamin (1mM), *Fetal Bovine Serum* (FBS)5% dan antibiotik Penisillin 50 unit dan Streptomisin 50µg/ml, kemudian disentrifus pada 400xg, 4°C selama 10 menit
 8. buang supernatan, bila perlu larutkan dengan 3% asam asetat dalam PBS untuk melisiskan sel darah merah, kemudian disentrifus pada 400xg, 4°C selama 10 menit
 9. Cuci dengan RPMI yang mengandung 2% FBS
 10. Resuspensikan dengan medium komplit
 11. Hitung sel dengan Hemacytometer
 12. kultur sel dalam medium komplit dengan kepadatan 5×10^5 sel/ml selama 24 jam dalam CO₂ inkubator pada suhu 37°C

4.8.4. Bahan, alat penelitian dan cara pemeriksaan NO

4.8.4.1. Bahan untuk pemeriksaan NO

1. Reagen

- Reagen 1 : *N-(1-naphthyl)ethylenediaminedihydrochloride* = NED (Sigma): 0,1g dilarutkan dalam 100 ml *distilled water*.

- Reagen 2: Sulfanilamide (Sigma): 1 g dilarutkan dalam 100 ml 5% *phosphoric acid*.

Keduanya harus disimpan pada refrigerator dalam botol gelap dan dapat digunakan dalam 6 minggu atau selama tak berubah warna menjadi lebih gelap.

Chromogenic reagent (Griess reagent): campur dengan volume sama banyak reagen 1 & 2 setiap akan digunakan. Dapat digunakan dalam 1 jam setelah disiapkan.

- Nitrit standard : Larutkan 69 mg NaNO_2 dalam 500 ml Distilled water (2 mM stock), kemudian buat pengenceran bertingkat dari 0 - 200 μM dengan cara melarutkan larutan stok menggunakan medium yang dipakai untuk kultur makrofag.

2. Supernatan Kultur Makrofag peritoneal.

4.8.4.2. Alat untuk pemeriksaan kadar NO

- | | |
|----------------------|-----------------|
| 1. Spuit 1 cc, 10 cc | 6. Inkubator |
| 2. Gunting | 7. ELIZA reader |
| 3. <i>Microplate</i> | 8. Mikroskop |
| 4. Tabung reaksi | 9. Pinset |
| 5. <i>Scalpel</i> | 10. Reagen |

4.8.4.3. Prosedur pemeriksaan NO

Penentuan kadar NO dalam supernatan kultur.

Modifikasi Metode Griess menurut Green *et al* (1982) dan Ding *et al*

(1988)

1. Gunakan *microplate 96-well* bawah datar (untuk ELISA), masukkan 100 μ l reagen Griess pada tiap sumuran.
2. Pipet 100 μ l supernatan / standard NaNO_2 ke dalam sumuran (duplo/triplo). Gunakan kontrol (medium) untuk blanko.
3. Tunggu 5 menit pada suhu kamar untuk perubahan warna & stabilisasi.
4. Ukur absorbansi pada 550 nm menggunakan *automated microplate reader* (ELISA reader).
5. Buat kurva standard menggunakan analisis regresi linier sederhana dari pembacaan standard. Tentukan konsentrasi nitrit dalam sampel berdasarkan kurva standard atau formula regresi.

4.10. Cara pengumpulan data

Masing-masing kelompok dilakukan pemeriksaan kadar NO supernatan kultur makrofag intraperitoneal.

4.11. Analisis data

Setelah data terkumpul dilakukan data *cleaning*, *coding* dan tabulasi. Data dikumpulkan dan diolah dengan menggunakan program komputer *SPSS 15.0 for windows* dan analisa data meliputi analisis deskriptif dalam bentuk rerata, *standart deviation* dan grafik. Pada variabel bebas didapatkan skala pengukuran

nominal yaitu diberi ketamin dan tidak diberi ketamin sedang pada variabel terikat untuk kadar NO didapatkan skala pengukuran rasio. Uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk test* untuk mengetahui sebaran data dan dilakukan uji beda dengan ANOVA dilanjutkan dengan uji post hoc untuk melihat beda antara kelompok K2, K3, dan K4 dengan kelompok K1 serta antara kelompok K2, K3 dan K4.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan 20 ekor mencit Balb/c jantan, dari keturunan murni berumur dua setengah bulan dan berat badan 20-40 gram. Penelitian menggunakan 4 kelompok yaitu kelompok kontrol (P1) terdiri dari 5 ekor mencit yang diberikan perlakuan LPS intraperitoneal 20 mg/kgBB. Kelompok perlakuan 1 (K2), kelompok perlakuan 2 (K3) dan kelompok perlakuan 3 (K4) masing-masing terdiri 5 ekor mencit mendapatkan perlakuan LPS intraperitoneal 20 mg/kgBB dan ketamin intravena (0,1 mg, 0,2mg dan 0,4 mg).

Kadar nitrit oksida dari tiap-tiap kelompok perlakuan dihitung dengan menggunakan metode modifikasi *Gries* dari *Green et al* dan *Ding et al*. Hasil reaksinya dibaca dengan alat *ELISA reader*, kemudian dilakukan pemeriksaan kadar NO makrofag intraperitoneal, konsentrasi kadar NO untuk masing-masing kelompok dihitung menggunakan persamaan regresi linier. Hasil dari pengukuran tersebut dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Kadar nitrit oksida pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (μM)

Sampel	K1	K2	K3	K4
1	41.12	13.76	11.82	8.82
2	42.33	16.53	12.94	10.17
3	41.70	13.62	14.20	10.80
4	44.66	15.07	10.37	10.13
5	46.60	15.46	9.11	13.47
Rerata	42,1	14,7	11,2	10,9

Hasil pengamatan rerata kadar NO makrofag intraperitoneal pada keempat

kelompok menunjukkan kadar NO yang berbeda yaitu pada kelompok perlakuan 3 (K4) menunjukkan penurunan kadar NO yang paling banyak dibandingkan kelompok kontrol (K1).

5.1. Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data parameter klinis atau laboratoris terdistribusi normal. Uji normalitas kadar NO makrofag intraperitoneal dilakukan dengan tehnik *Shapiro-Wilk*. Hasil uji normalitas kadar NO makrofag intraperitoneal ini terlihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji normalitas kadar *nitric oxide* makrofag intraperitoneal

kelompok perlakuan	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
ketamin 0,1 mg	.926	5	.568
ketamin 0,2 mg	.985	5	.957
ketamin 0,4mg	.895	5	.382
kontrol	.904	5	.434

Dari tabel 3 dapat dilihat bahwa kadar NO makrofag intraperitoneal pada kelompok kontrol (K1), kelompok perlakuan 1 (K2), kelompok perlakuan 2 (K3) dan kelompok perlakuan 3 (K4) terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$.

5. 2. Uji beda

Uji beda dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna kadar NO makrofag intraperitoneal pada kelompok kontrol (K1), kelompok perlakuan 1 (K2) dan kelompok perlakuan 2 (K3) dan kelompok perlakuan 3 (K4). Uji beda ini dilakukan dengan menggunakan ANOVA dan

dilanjutkan dengan uji hipotesis. Hasil uji beda kadar NO makrofag intraperitoneal pada keempat kelompok terlihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji beda kadar *Nitric Oxide* makrofag intraperitoneal terhadap K1 (kontrol) menggunakan *One Way Analysis of Variance* (ANOVA)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3620.506	3	1206.835	350.908	.000
Within Groups	55.027	16	3.439		
Total	3675.533	19			

Uji homogenitas didapatkan data homogen dengan $p > 0,05$ sehingga uji ANOVA yang didapatkan adalah valid. Tabel 4 yaitu tabel uji ANOVA didapatkan hasil signifikan ($p < 0,001$) dengan interpretasi bahwa paling tidak, akan didapatkan perbedaan bermakna dari dua kelompok penelitian, uji statistik kemudian dilanjutkan uji *Post Hoc* dengan LSD seperti tampak pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji *Post Hoc* kadar *Nitric Oxide* makrofag intraperitoneal

	K2 ketamin 0,1 mg	K3 ketamin 0,2 mg	K4 ketamin 0,4 mg
Kontrol (K1)	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
K2		$P = 0,015$	$P = 0,002$
K3			$P = 0,402$

Dari tabel 5 dapat dilihat bahwa kadar NO makrofag intraperitoneal pada kelompok K1 (kontrol) dibanding dengan masing-masing kelompok perlakuan (K2,K3,K4) terdapat perbedaan bermakna dengan nilai $p < 0,001$. Terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar NO makrofag intraperitoneal pada kelompok perlakuan K2 dibandingkan kelompok perlakuan K3 ($p = 0,015$) dan kelompok perlakuan K2 dibandingkan kelompok perlakuan K4 ($p = 0,002$), sedangkan kadar NO makrofag intraperitoneal pada kelompok perlakuan K3

dibandingkan kelompok perlakuan K4 berbeda tidak bermakna dengan nilai $p = 0,402$ ($p > 0,05$).

BAB 6

PEMBAHASAN

Endotoksin atau LPS adalah suatu komponen membran luar dari bakteri gram negatif yang dapat menginduksi sepsis. Patofisiologi sepsis sudah banyak diketahui tetapi terapi masih terbatas dan mortalitasnya masih tinggi. Efek paparan LPS menyebabkan pelepasan beberapa sitokin (TNF, NFκB, IL-1, IL-8) sebagai media pertahanan tubuh terhadap benda asing yang memiliki dampak positif dan negatif. Pada sepsis terjadi pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF-α, IL-1β, IL-8 yang berhubungan dengan kerusakan endotel dan jaringan yang nantinya akan menyebabkan hipotensi sistemik, hiporeaktif vaskuler, dan depresi miokard.³⁴

Nitric oxide adalah molekul biologi yang dihasilkan oleh berbagai jenis sel, mempunyai pengaruh yang baik dan juga buruk ditingkat pembuluh darah dan seluler. NO merupakan kunci penting pada patogenesis sepsis. Pada pemberian LPS akan merangsang pelepasan mediator proinflamasi seperti IFN-γ, TNF-α, serta IL-1 yang akan menginduksi aktivasi iNOS dalam memproduksi NO. Makrofag merupakan komponen penting dari respons inflamasi terhadap injuri jaringan dan merupakan tipe sel untuk pemeriksaan kadar NO terutama iNOS.⁷

Hasil pengamatan dapat dilihat bahwa terdapat penurunan kadar NO makrofag intraperitoneal yang bermakna pada pemberian ketamin baik pada dosis 0,1 mg, 0,2 mg maupun pada pemberian ketamin dosis 0,4 mg dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi ketamin. Dari penelitian ini juga didapatkan bahwa pemberian ketamin dosis 0,4 mg menurunkan kadar NO makrofag intraperitoneal

yang paling besar dibanding kelompok perlakuan yang lain apabila dilihat dari rerata kadar NO.

Kawasaki dkk. (1999) menyatakan bahwa ketamin menekan TNF- α , IL-6 dan IL-8 yang diinduksi oleh LPS. Dimana TNF- α merupakan sitokin pertama yang terinduksi setelah stimulasi LPS yang kemudian juga akan menstimulasi IL-1 dan IL-6 pada makrofag, monosit, neutrofil dan sel endotel. Efek supresi ketamin terhadap IL-6 dan IL-8 dapat secara langsung maupun melalui penghambatan pelepasan TNF- α yang diinduksi oleh LPS. Pada penelitian ini penurunan kadar NO makrofag akibat iNOS tidak teraktivasi dikarenakan efek supresi ketamin terhadap TNF- α serta IL-6 dan IL-8.¹²

Pengaruh pemberian anestesi terhadap sistem pertahanan tubuh dan sistem imun secara luas belum banyak diketahui. Beberapa penelitian melaporkan adanya efek immunosupresan akibat pemberian agen anestesi. Pada kondisi normal sistem imun mempunyai efek proteksi yang sangat dibutuhkan tubuh, tetapi jika sistem imun ini bereaksi berlebihan akan menyebabkan efek sitotoksik dan dapat merusak jaringan normal pada tubuh, hal tersebut dapat dilihat pada kondisi sepsis, *acute respiratory distress syndrom* (ARDS), penyakit autoimun dan cedera iskemia pada otak. Yang J dkk. (2005) ketamin pada dosis tertentu menghambat produksi TNF- α sehingga dapat mencegah induksi iNOS pada kultur makrofag alveolar akibat pemberian LPS.²⁸

Faktor transkripsi NF- κ B mempunyai peranan krusial pada proses inflamasi. NF- κ B merupakan faktor transkripsi yang akan memicu produksi sitokin. Pemberian LPS akan mengaktifkan NF- κ B yang akan meningkatkan produksi mediator inflamasi seperti IL-8, TNF- α , *intercellular adhesion molecule* (ICAM) dan

cyclooxygenase-2. Danielle PK dkk.(2004) menyatakan dalam penelitiannya bahwa ketamin menghambat aktivasi NF- κ B melalui penekanan degradasi I κ B- α dan translokasi NF- κ B pada sel makrofag meskipun pada dosis subanestesi, sehingga ketamin secara signifikan akan menurunkan konsentrasi TNF- α dan IL-6.^{9,31}

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa ketamin pada dosis 0,4 mg pada mencit yang setara dengan pemberian dosis ketamin 2 mg/kgBB pada manusia tidak menurunkan kadar NO secara signifikan dibandingkan dengan ketamin dosis 0,2 mg pada mencit yang setara dengan pemberian ketamin 1 mg/kgBB pada manusia. Penelitian yang telah dilakukan mendapatkan bahwa ketamin dosis 0,2 mg pada mencit yang setara dengan 1 mg/kgBB pada manusia merupakan dosis yang efektif dalam menekan produksi NO.

Sarton dkk (2001) ketamin dalam kadar yang besar pada susunan saraf pusat akan menyebabkan terjadinya depresi nafas. Hal tersebut diakibatkan mekanisme kerja ketamin pada reseptor opioid μ (μ). Dimana opioid endogen memiliki peran dalam pengaturan ritme nafas. Ketamin juga bekerja dengan menghambat NMDA yang mempunyai peran dipusat kemoreseptor CO₂ dan juga mengatur irama pernafasan. Pada pemberian ketamin 0,4 mg pada mencit dapat menyebabkan penurunan frekuensi nafas yang dapat menyebabkan hipoksia. Bila proses hipoksia terus berlanjut akan mengakibatkan iskemik jaringan.³²

Xu dkk menyatakan bahwa penurunan glukosa dan oksigen dapat menginduksi ekspresi iNOS pada sel endotel. Sementara itu, sejumlah besar NO yang dihasilkan oleh iNOS dapat menyebabkan kematian sel endotel melalui mekanisme apoptosis, selain itu juga menyebabkan disfungsi sel endotel yang menghasilkan disregulasi

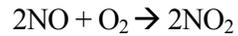
vaskular dan mempercepat iskemia.³⁴

Disisi lain pemberian ketamin pada dosis besar akan menyebabkan peningkatan stimulasi pada sistem simpatis, akan terjadi vasokonstriksi pembuluh darah serta peningkatan oksigenasi jaringan. Efek iskemia adalah reversibel jika iskemia terjadi dalam waktu singkat, dimana sel dapat kembali menjadi normal setelah adanya reoksigenasi. Jika iskemia berlangsung lama, maka sel akan mengalami iskemia yang ireversibel dan bila terjadi reperfusi, maka terjadi kerusakan baru pada sel melalui peningkatan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS).^{32,33}

Produksi ROS terjadi dari disfungsi mitokondria, seperti yang klasik terjadi pada syok septik serta konversi xanthin dehidrogenase menjadi xanthin oksidase yang teraktivasi selama iskemia dan trauma reperfusi. ROS dapat memacu pelepasan sitokin dari sel imun, mengaktivasi kaskade inflamasi, dan meningkatkan ekspresi adhesi molekul, yang diperantarai melalui peningkatan ekspresi NF-kB sehingga respons inflamasi berlipat ganda serta memperparah kerusakan jaringan. Jalur dan lingkaran ini merupakan sentral yang mendasari patofisiologi penyakit kritis dengan respons inflamasi sistemik dan disfungsi multiorgan.^{6,34}

Nitric oxide bereaksi dengan radikal bebas yang lain secara istimewa. Reaksi NO dengan oksigen menghasilkan nitrogen dioksida, suatu oksidan kuat. Tetapi reaksi ini tidak relevan secara *in vivo*. Reaksi NO dengan superoksida terjadi dengan sangat cepat dan menghasilkan peroksinitrit. Peroksinitrit ini dapat mengakibatkan reaksi oksidasi yang merugikan dengan beberapa molekul biologi, seperti asam amino, gula dan lemak. Pada reaksi yang serupa, NO dapat juga bereaksi dengan radikal peroksil, misalnya radikal peroksil lemak, dan menghambat reaksi ikatan radikal bebas seperti

peroksidasi lemak.³⁴



Mediator-mediator penting yang berperan pada iskemia reperfusi meliputi: *reactive oxygen spesies/reactive nitrogen spesies* (terutama O_2^- , H_2O_2 , NO dan ONOO) kadar glutamat yang tinggi menyebabkan eksitotoksisitas, perubahan metabolisme miokardium dan serebral, pelepasan ion katalitik, peningkatan Ca^{2+} intraseluler, disfungsi endotel dan mikrovaskular serta akumulasi asam lemak bebas karena aktivasi enzim fosfolipase A_2 .³⁴

Percobaan pada binatang membuktikan bahwa derajat inhibisi NOS merupakan hal penting bagi *outcome* terapi, tetapi pada dosis besar akan mengakibatkan vasokonstriksi, kerusakan *end-organ*, dan mempercepat kematian

Penelitian ini mempunyai keterbatasan dimana NO diperiksa hanya dari makrofag intraperitoneal dan tidak memeriksa NO dari plasma. Hal ini dikarenakan pengambilan dan batasan pengambilan darah pada mencit yang hanya maksimal 0,1875 cc sehingga pemeriksaan kadar NO pada plasma darah lebih sulit dilakukan.

BAB 7

SIMPULAN dan SARAN

7.1. Simpulan

- 7.1.1 Pemberian ketamin dosis 0,1 mg, 0,2 mg dan 0,4 mg intravena menunjukkan perbedaan bermakna pada kadar NO makrofag intraperitoneal dibanding kontrol pada mencit yang diberi LPS
- 7.1.2 Pemberian ketamin dosis 0,2 mg intravena merupakan dosis yang efektif untuk menurunkan kadar NO makrofag intraperitoneal pada mencit yang di beri LPS

7.2. Saran

Agar dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis ketamin pada manusia terhadap penurunan kadar NO dan peningkatan sistem imun pada kondisi sepsis, sehingga diharapkan akan didapat hasil penelitian yang lebih baik dan bermanfaat dalam pengelolaan sepsis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *The FASEB Journal* 2001;15:879-92.
2. RL Paterson, NR Webster. Sepsis and the Systemic inflammatory Response Syndrome. *R.Coll.Surg.Edinb* 2000;178-82.
3. Hotchkiss SR, Karl EI. *The Pathophysiology and Treatment of Sepsis*. 2003;348:138-50.
4. Barash G, Paul MD. Septic shock. *Clinical Anesthesia*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers 2001; p1069-76
5. Karl IE. Pathogenesis of sepsis and multiorgan dysfunction. *J Cell Biochem* 1992;267:10931-44.
6. Hermawan AG. SIRS dan Sepsis (Imunologi, Diagnosis, Penatalaksanaan). Sebelas Maret University Press. Edisi pertama. Mei 2006.
7. Vincent JL, Zhang J, Szabo C, Preiser JC. Effect of Nitric Oxide in Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;16(1):1781-85.
8. Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric oxide pathway. *NEJM* 1993;329:2002-12.
9. Danielle P K, Bull S, Duk P V, Gremmels J, Hellebrekers L. Ketamine inhibits LPS-induced Tumor Necrosis Faktor-alpha and Interleukin-6 in an Equine Macrophag Cell Line. *Section Anesthesiologi and Intensive Care, Utrecht University*; 2005: 257-62.
10. Shimaoka M, Iida A, Ohara, Taenaka N, Mashimoto T, Honda T. Ketamine inhibisi nitric oxide production in mouse-activated macrophage-like cell. *British journal of Anesthesia* 1996; 77: 238-42
11. Yuan C, Cou C, Shung C, Ding Y, Yen M. Ketamine inhibits nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated rat alveolar macrophages. *Can J Anesthesia* 2001; 44(9):989-95
12. Kawasaki C, Kawasaki T, Ogata M, Nandate K, Shigematsu A. Ketamine isomers suppress supernatigen-induced proinflammatory cytokine production in human whole blood. *Can J Anesthesia* 2001;48(8):819-23
13. Arnold S, Kristof, Peter G, Victor L, Sabah AH. Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Endotoxin-induced Acute Lung Injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 1998;158(6):1883-89.
14. Abbas AK. *Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Companies. 2007; p175-85.
15. Wright G, Singh IS, Hasday JD, Farrance IK, Hall G, Cross AS, and Rogers TB. Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF- κ B activation and tumor necrosis factor- α expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:872-79.

16. Szabo C, Thiemermann C, Wu CC, Peretti M, Vane RJ. Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance in vivo. *National Academy of Science* 1994;91:271-275.
17. Szabo C, Cuzzocrea S, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman LA. Endothelial Dysfunction in Rat Model of Endotoxic Shock. *Journal of Clinical Investigation* 1997;100(3):723-35.
18. Chandar A, Enkhbaatar P, Nakano Y, Traber DL. Sepsis: emerging role of nitric oxide and selectin. *Clinics*.2006;61(1):71-6
19. Schoonover LL, Stewart SA, Clifton DG. Hemodynamic and Cardiovascular Effects of Nitric Oxide Modulation in the Therapy of Septic Shock. *Pharmacotherapy Publications* 2000;20(10):1184-97.
20. Lorente AJ, Landin L, Esteban A. Nitric Oxide in Critical Illness. In: Shoemaker, Ayres, Grenvik, Holbrook. *Textbook of Critical Care*. 4th Ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000: p630-39.
21. Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ, Larson CP. Nonvolatile anesthetic agents. In : Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ, Larson CP. *Clinical Anesthesiology* 4th ed. New York : Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Edition, 2006 : p164.
22. Stoelting, Hiller. *Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice*. 4th Ed. Philadelphia: Williams and Wilkins; 2006: p141-54.
23. Reves GJ, Glass ASP, Lubarsky AD. Nonbarbiturate Intravenous Anesthetics. In: Miller DR. *Anesthesia*. 5th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000:p229-72.
24. Ladish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky S, Lawrence, Matsudaira P, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 3rd ed. New York: Scientific American Books; 1996. p. 886–98,1247–70.
25. Yang J, Li W, Duan M, Zhou Z, Lin N, Wang Z, Sun J, Xu . Large dose ketamine inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Inflamm Res*. 2005 Mar;54(3):133-7
26. Taniduchi T, Yamamoto K. Anti-Inflammatory Effect of Intravenous Anesthetics on Endotoxemia. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. Vol 5. No 3 .2005; 12-9.
27. Sun J, Feng F, Chen J, Xu J. Ketamine suppresses endotoxin-induced NF-kB and cytokines production in the intestine. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*.2004; 48 : 317-21.
28. Dietert RR, Hotchkiss JH, Austic RE, Sung Y. Production of Reactive Nitrogens Intermediates by Macrophages. In: *Methods in Immunotoxicology* vol 2, editor: Burleson GR, Dean JH, Munson AE. New York: A John Wilye Liss & sons Inc Publ, 1995; 99-117
29. Tripathi P, Agarwal A. NF-kB transcription factor : a key player in the generation of immune response. *Current science*, Vol 90.No 4. 2006; 519-29
30. Zhang H, Rogiers P, Cabral A, Preiser JC, Peny MO, Vincent JL. Effects of nitric oxide on blood flow distribution and Oxygen extraction capabilities during endotoxin shock. *Department of Intensive Care. Erasme Hospital University. The American Physiological Society*.Vol 17.No 12. 2004; 1164-71

31. Kurniasih R, Wijaya A. Peran radikal bebas pada iskemia-reperfusi serebral atau miokardium. Forum Diagnosticum Prodia Diagnostics Educational Services 2002; 1-23.
32. Sarton E, Teppema LJ, Olievier C, Neuwenhuies, Matthes H, Kiffer BL, Dahan A. The Involvement of the Opioid Receptor in Ketamine-Induced Respiratory Depression and Antinociception. Anesthesia and Analgesia journal 2001;93:1495–500.
33. Jimi N, Segawa K, Minami K, Sata T, Shigemitsu A. Inhibitory Effect of the Intravenous Anesthetic, Ketamine, on Rat Mesangial Cell Proliferation. Anesthesia and Analgesia journal 1997;84:190-5.
34. Hogg N. Pro-oxidant and Antioxidant Effect of Nitric Oxide. In: Favier EA, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre LJ. Analysis of Free Radicals in Biological Systems. Switzerland; 2001:37-49

Lampiran 1. Data dan Hasil Analisa
Data hasil kadar *nitric oxide*

Kelompok		NO(uMol/liter)
K4	0.358	13.76
K4	0.415	16.53
K4	0.355	13.62
K4	0.385	15.07
K4	0.393	15.46
K3	0.318	11.82
K3	0.341	12.94
K3	0.367	14.20
K3	0.288	10.37
K3	0.262	9.11
K2	0.256	8.82
K2	0.284	10.17
K2	0.297	10.80
K2	0.283	10.13
K2	0.352	13.47
K1	0.922	41.12
K1	0.947	42.33
K1	0.934	41.70
K1	0.995	44.66
K1	1.035	46.60

Descriptives

kelompok perlakuan		Statistic	Std. Error			
kadar NO	ketamin 0,1 mg	Mean	14.8880	.54482		
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	13.3753		
			Upper Bound	16.4007		
		5% Trimmed Mean	14.8672			
		Median	15.0700			
		Variance	1.484			
		Std. Deviation	1.21827			
		Minimum	13.62			
		Maximum	16.53			
		Range	2.91			
		Interquartile Range	2.31			
		Skewness	.264	.913		
		Kurtosis	-1.428	2.000		
		ketamin 0,2 mg	ketamin 0,2 mg	Mean	11.6880	.90217
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	9.1832
Upper Bound	14.1928					
5% Trimmed Mean	11.6917					
Median	11.8200					
Variance	4.070					
Std. Deviation	2.01732					
Minimum	9.11					
Maximum	14.20					
Range	5.09					
Interquartile Range	3.83					
Skewness	-.082			.913		
Kurtosis	-1.248			2.000		
ketamin 0,4mg	ketamin 0,4mg			Mean	10.6780	.76879
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	8.5435
		Upper Bound	12.8125			
		5% Trimmed Mean	10.6261			
		Median	10.1700			
		Variance	2.955			
		Std. Deviation	1.71906			
		Minimum	8.82			
		Maximum	13.47			
		Range	4.65			
		Interquartile Range	2.66			
		Skewness	1.235	.913		
		Kurtosis	2.426	2.000		
		Control	Control	Mean	43.2820	1.02448

95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	40.4376	
	Upper Bound	46.1264	
5% Trimmed Mean		43.2178	
Median		42.3300	
Variance		5.248	
Std. Deviation		2.29081	
Minimum		41.12	
Maximum		46.60	
Range		5.48	
Interquartile Range		4.22	
Skewness		.839	.913
Kurtosis		-1.022	2.000

Tests of Normality

kelompok perlakuan		Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kadar NO	ketamin 0,1 mg	.223	5	.200(*)	.926	5	.568
	ketamin 0,2 mg	.143	5	.200(*)	.985	5	.957
	ketamin 0,4mg	.272	5	.200(*)	.895	5	.382
	Control	.261	5	.200(*)	.904	5	.434

* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

konsentrasi kadar NO

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.969	3	16	.432

ANOVA

konsentrasi kadar NO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3620.506	3	1206.835	350.908	.000
Within Groups	55.027	16	3.439		
Total	3675.533	19			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: konsentrasi kadar NO
LSD

(I) kelompok perlakuan	(J) kelompok perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
ketamin 0,1 mg	ketamin 0,1 mg					
	ketamin 0,2 mg	3.20000(*)	1.17289	.015	.7136	5.6864
	ketamin 0,4mg	4.21000(*)	1.17289	.002	1.7236	6.6964
ketamin 0,2 mg	Control	-28.39400(*)	1.17289	.000	-30.8804	-25.9076
	ketamin 0,1 mg	-3.20000(*)	1.17289	.015	-5.6864	-.7136
	ketamin 0,2 mg					
ketamin 0,4mg	ketamin 0,4mg	1.01000	1.17289	.402	-1.4764	3.4964
	Control	-31.59400(*)	1.17289	.000	-34.0804	-29.1076
	ketamin 0,1 mg	-4.21000(*)	1.17289	.002	-6.6964	-1.7236
kontrol	ketamin 0,2 mg	-1.01000	1.17289	.402	-3.4964	1.4764
	ketamin 0,4mg					
	Control	-32.60400(*)	1.17289	.000	-35.0904	-30.1176
kontrol	ketamin 0,1 mg	28.39400(*)	1.17289	.000	25.9076	30.8804
	ketamin 0,2 mg	31.59400(*)	1.17289	.000	29.1076	34.0804
	ketamin 0,4mg	32.60400(*)	1.17289	.000	30.1176	35.0904
	Control					

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 3

CARA PEMELIHARAAN DAN DEKAPITASI HEWAN COBA

A. Cara pemeliharaan

Mencit yang dipilih adalah yang berumur kurang lebih 8 minggu. Mencit dipelihara dalam kandang selama 7 hari. Masing-masing kandang berisi 6 ekor mencit. Mencit diberi makanan dan minuman yang sama.

B. Cara memegang mencit

Untuk memegang mencit yang akan diperlakukan (baik pemberian obat maupun pengambilan darah) maka diperlukan cara-cara yang khusus sehingga mempermudah cara perlakuannya. Secara alamiah mencit cenderung menggigit bila mendapat sedikit perlakuan kasar. Pengambilan mencit dari kandang dilakukan dengan mengambil ekornya kemudian mencit ditaruh pada kawat kasa dan ekornya sedikit ditarik. Cubit kulit bagian belakang kepala dan jepit ekornya.

C. Cara penyuntikan

Mencit dimasukkan dalam alat pemegang mencit, sehingga mencit lebih mudah dikendalikan. Tarik ekornya dan kemudian penyuntikan dilakukan pada bagian lateral ekor, yang sebelumnya diusap kapas yang dibasahi dengan air hangat agar vena tampak lebih jelas. Dimasukkan obat injeksi sebanyak 0,2 cc.

D. Euthanasia

Mencit dibunuh dengan cara melakukan dislokasi pada tulang leher. Dengan cara menaruh mencit di permukaan rata kemudian sebuah pensil diletakkan di kuduk mencit. Sambil menekan pensil, ekor ditarik kuat-kuat dan diarahkan ke atas kepala mencit.

Mengetahui
Laboratorium Biokimia FK UNDIP