

**PENGARUH PEMBERIAN KETAMIN INTRAVENA
TERHADAP INDEKS APOPTOSIS LIMFOSIT LIEN
MENCIT BALB/C YANG TERPAPAR
LIPOPOLISAKARIDA INTRAPERITONEAL**

*THE EFFECT OF INTRAVENOUS KETAMINE ON APOPTOTIC
INDEX OF LYMPHOCYTES OF SPLEEN OF BALB/C MICE WITH
INTRAPERITONEAL INJECTION OF LIPOPOLYSACCHARIDE*



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

Ardana Tri Arianto

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

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN KETAMIN INTRAVENA
TERHADAP INDEKS APOPTOSIS LIMFOSIT LIEN MENCIT BALB/C
YANG TERPAPAR LIPOPOLISAKARIDA INTRAPERITONEAL**

disusun oleh

Ardana Tri Arianto

telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 12 Juni 2009
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama

Pembimbing Kedua

dr. Jati Listiyanto, SpAn
NIP. 140 243 846

Prof. dr. Edi Dharmana, Msc, PhD, SpPar(K)
NIP. 130 529 451

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. 130 352 549

PERNYATAAN

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

Semarang, Juni 2009

Ardana Tri Arianto

DAFTAR ISI

JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR SINGKATAN	ix
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	x
KATA PENGANTAR	xi
ABSTRAK	xiii
<i>ABSTRACT</i>	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.5. Originalitas.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Lipopolisakarida.....	6
2.2. Hubungan LPS dengan Apoptosis.....	8
2.3. Apoptosis.....	9
2.3.1. Aktivasi NF-kB.....	14
2.3.2. Apoptosis sel limfosit.....	15
2.3.3. Uji TUNEL	16
2.7. Peranan lien pada proliferasi limfosit.....	17
2.8. Ketamin.....	19
BAB 3. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEPTUAL	23
DAN HIPOTESIS	

4.1	Kerangka Teori.....	23
4.2.	Kerangka Konseptual	24
4.3.	Hipotesis.....	24
BAB 4.	METODE PENELITIAN.....	25
3.1.	Rancangan Penelitian	25
3.2.	Waktu dan Tempat Penelitian.....	26
3.3.	Populasi dan Sampel Penelitian.....	26
3.4.	Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	26
3.5.	Besar Sampel.....	26
3.6.	Randomisasi.....	27
3.7.	Variable Penelitian.....	27
3.8.	Kerangka Kerja Penelitian.....	28
3.9.	Definisi Operasional.....	29
3.10.	Bahan dan Alat Penelitian.....	29
3.11.	Cara Kerja.....	30
3.12.	Cara Pengumpulan Data.....	32
3.13.	Analisis Data.....	32
BAB 5.	HASIL PENELITIAN	33
BAB 6.	PEMBAHASAN	36
BAB 7.	SIMPULAN DAN SARAN	40
	DAFTAR PUSTAKA.....	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Gambar Lipopolisakarida.....	6
Gambar 2.	Jalur terjadinya nekrosis dan apoptosis.....	10
Gambar 3.	Jalur sinyal apoptosis secara luas, melalui jalur sinyal ekstrinsik dan intrinsik	12
Gambar 4.	Jalur apoptosis melalui TNF-R1, Fas R, Granzyme, Steroid..	13
Gambar 5.	Jalur apoptosis melalui peranan mitokondria	14
Gambar 6.	Grafik box plot indeks apoptosis limfosit	34
Gambar 7.	Gambar apoptosis dengan metode TUNEL	35

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Rerata indeks apoptosis limfosit	33
Tabel 2.	Uji beda indeks apoptosis limfosit terhadap kelompok kontrol	34

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Primer dan Hasil Uji Analisis Data	43
Lampiran 2. Persetujuan Ethical Clearance	47

DAFTAR SINGKATAN

CARS	: <i>Compensatory Anti Inflammatory Response Síndrome</i>
DISC	: <i>Death-Induced Signaling Complex</i>
ER	: <i>Endoplasmic Reticulum</i>
IL-1	: <i>Interleukin 1</i>
IL-2	: <i>Interleukin 2</i>
IL-6	: <i>Interleukin 6</i>
IL-8	: <i>Interleukin 8</i>
IAP	: <i>Inhibitory Apoptosis</i>
iNOS	: <i>Inducible Nitric Oxide Syntase</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
LBP	: <i>Lipopolysaccharide Binding Protein</i>
MOF	: <i>Multi Organ Failure</i>
MODS	: <i>Multi Organ Dysfunction Syndrome</i>
NFκB	: <i>Nuclear Factor kappa B</i>
NMDA	: <i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
PAF	: <i>Platelet Activating Factor</i>
PI	: <i>Propidium Iodide</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SIRS	: <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
TNF-α	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TUNEL	: <i>TdT-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling</i>

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr. Ardana Tri Arianto
NIM Magister Biomedik : G4A006019
Tempat / Tgl lahir : Kebumen, 7 Januari 1979
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki – laki

B. Riwayat Pendidikan

1. SD Santo Yusuf Semarang & SD Marsudirini Surakarta : Lulus tahun 1991
2. SMP Pangudi Luhur Bintang Laut Surakarta : Lulus tahun 1994
3. SMAN 3 Surakarta : Lulus tahun 1997
4. FK UNDIP Semarang : Lulus tahun 2004
5. PPDS 1 Anestesiologi UNDIP Semarang Jawa Tengah
6. Magister Ilmu Biomedik Pasca Sarjana UNDIP Semarang Jawa Tengah

C. Riwayat Keluarga

1. Nama Orang tua, Ayah : dr Sumartanto SpAn KIC
Ibu : Tri Hartiningsih

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat, taufik dan hidayah-Nya, sehingga kami dapat menyelesaikan tugas dalam rangka mengikuti Program Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.

Tesis ini dibuat dalam rangka menyelesaikan pendidikan spesialis anesthesiologi dan Program Magister Ilmu Biomedik yang kami tempuh. Adapun judul tesis adalah **“Pengaruh Pemberian Ketamin Intravena terhadap Indeks Apoptosis Limfosit Lien Mencit Balb/c yang Terpapar Lipopolisakarida Intraperitoneal”**.

Pada kesempatan ini kami juga menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang sebesar – besarnya kepada :

1. **Orang tua dan saudara-saudara** kami yang selalu mendukung dan selalu memberi motivasi untuk menyelesaikan tesis ini.
2. **Prof. Dr. dr. Susilo Wibowo, MS, MED, Sp.And** selaku Rektor Universitas Diponegoro Semarang.
3. **Dr. Soejoto, PAK, SpKK(K)** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
4. **DR. dr. Winarto, SpMK, SpM** selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
5. **Dr. Hariyo Satoto, SpAn(K)** selaku Kepala Bagian / SMF Anesthesiologi FK UNDIP / RSUP Dr. Kariadi Semarang.
6. **Dr. Uripno Budiono, SpAn(K)** selaku Ketua Program Studi Anesthesiologi yang telah memberikan kesempatan kepada kami menempuh Pendidikan Program Magister Ilmu Biomedik.

7. **Dr. Jati Listyanto Pujo, SpAn** selaku pembimbing utama dalam tesis ini. Kami mengucapkan terima kasih karena telah memberikan petunjuk, bimbingan serta waktu dan tenaga sehingga tesis ini dapat selesai.
8. **Prof. dr. Edi Dharmana, MSc, PhD, SpPar(K)** selaku pembimbing kedua dalam tesis ini. Kami mengucapkan terima kasih karena telah memberikan petunjuk, bimbingan serta waktu dan tenaga sehingga tesis ini dapat selesai.
9. **Prof. Drs. Y. Warella, MPA, PhD** selaku Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro. .
10. Kepada guru-guru kami, staf pengajar Bagian Anestesiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang yang telah memberikan bimbingan, motivasi dan ilmu anesthesiologi kepada kami.
11. Guru-guru Program Studi Magister Ilmu Biomedik Pasca Sarjana Universitas Diponegoro.
12. Semua pihak yang telah membantu yang tidak mungkin disebut satu persatu.
Akhir kata, kami mohon maaf atas segala kesalahan dan kekhilafan baik yang disengaja maupun yang tidak disengaja, baik itu perkataan atau perbuatan yang kami lakukan selama menyelesaikan tesis ini.

Hormat kami,

dr. Ardana Tri Arianto

ABSTRAK

Latar Belakang : Lipopolisakarida dapat mengaktivasi respon imun dan menstimulasi pelepasan sejumlah mediator inflamasi sehingga terjadi apoptosis dan kegagalan organ. Ketamin, obat anestesi yang mempunyai efek sedasi dan analgesia sering digunakan untuk penderita sepsis, diduga memiliki efek anti inflamasi melalui penghambatan mediator inflamasi sehingga proses apoptosis dapat dihambat.

Tujuan : Mengetahui pengaruh pemberian Ketamin dengan dosis 0,5 ; 5 ; 50 mg/kg terhadap indeks apoptosis limfosit mencit Balb/c yang diberi lipopolisakarida intraperitoneal.

Metode : Merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan desain *randomized post test only controlled group* pada 20 ekor mencit Balb/c yang disuntik lipopolisakarida intraperitoneal dan ketamin intravena. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok secara random, yaitu kelompok K sebagai kontrol. Semua kelompok disuntik lipopolisakarida intraperitoneal 20 mg/kg dan 6 jam kemudian diberi ketamin 0,5 ; 5 ; 50 mg/kg intravena untuk kelompok P1, P2, P3. Pemeriksaan indeks apoptosis menggunakan metode TUNEL setelah 6 jam pemberian ketamin. Hasil dinilai dengan SPSS 12 dengan derajat kemaknaan $p < 0,05$.

Hasil : Uji beda dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan post hoc menunjukkan adanya perbedaan signifikan indeks apoptosis limfosit antara kelompok K dengan P1 ($49,00 \pm 12,94$ vs $17,00 \pm 5,70$, $p=0,002$). Perbedaan yang tidak signifikan pada kelompok K dengan P2 ($49,00 \pm 12,94$ vs $30,00 \pm 10,61$, $p=0,068$) dan kelompok K dengan P3 ($49,00 \pm 12,94$ vs $43,00 \pm 13,51$, $p=0,829$).

Simpulan : Ketamin dosis 0,5 mg/kg efektif menurunkan indeks apoptosis limfosit lien pada mencit Balb/c yang terpapar lipopolisakarida secara signifikan. Ketamin dosis 5 mg/kg dan 50 mg/kg tidak menunjukkan penurunan indeks apoptosis limfosit lien yang signifikan pada mencit Balb/c yang terpapar lipopolisakarida.

Kata Kunci : ketamin, lipopolisakarida, indeks apoptosis

ABSTRACT

Background : Lipopolysaccharide may induce immunologic responses and stimulate releasing of inflammatory mediators resulting apoptosis and multi organ failure. Ketamine is an anesthetic agent with sedating and analgesic effect, which is often administered in septic patients. This agent is presumed to have anti-inflammation effect through inflammatory mediators inhibitions to inhibit apoptotic process.

Purpose : To identify effect of ketamine 0,5 ; 5 ; 50 mg/kg dose toward apoptotic index in Balb/c mice lymphocyte with intraperitoneal lipopolysaccharide.

Method : This is a laboratory setting experiment with randomized post test only controlled group design. Twenty Balb/c mice injected intraperitoneally with lipopolysaccharide and intravenous ketamine. The mice were given the same procedure intraperitoneal lipopolysaccharide 20 mg/kg and intravenous ketamine 0,5 ; 5 ; 50 mg/kg 6 hours afterward each for the P1, P2, P3 group, respectively. Apoptotic index was reserved with TUNEL method 6 hours after intravenous ketamine administration. The result were then analyzed by SPSS 12 with significance of $p < 0,05$.

Result : ANOVA and post hoc test yielded that there was significant difference between lymphocyte apoptotic index of K compared to P1 group ($49,00 \pm 12,94$ vs $17,00 \pm 5,70$, $p=0,002$). In contrast, there was no significant difference between K and P2 group ($49,00 \pm 12,94$ vs $30,00 \pm 10,61$, $p=0,068$) and K compared with P3 group ($49,00 \pm 12,94$ vs $43,00 \pm 13,51$, $p=0,829$).

Conclusion : The Ketamine dose of 0,5 mg/kg is effective to decrease apoptotic index in Balb/c mice exposed lipopolysaccharide significantly. Dose of 5 mg/kg and 50 mg/kg revealed no significant decrease on lymphocyte apoptotic index in Balb/c mice exposed lipopolysaccharide.

Keywords : ketamine, lipopolysaccharide, apoptotic index

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sepsis merupakan salah satu penyebab terpenting *multiple organ failure* dan selalu dihubungkan dengan tingginya angka mortalitas. Syok septik dan *multiple organ failure/dysfunction syndrome* (MOF/MODS) sebanding dengan *outcome* yang buruk, dan syok septik merupakan penyebab kematian terbesar di ruang perawatan intensif (ICU). Mortalitas bervariasi dari 40% untuk sepsis tanpa komplikasi sampai 80% pada sepsis dengan syok dan MODS.^{1,2} Di Amerika Serikat insiden sepsis berkembang dari 160.000 kasus tahun 1979, menjadi 700.000 tahun 2000 (meningkat 13,7% pertahun).³

Lipopolisakarida (LPS), komponen membran luar bakteri gram negatif, dikenal sebagai faktor penting pada sepsis. Syok septik disebabkan karena adanya respons sistemik terhadap endotoksemia yang dipacu oleh bakteri gram negatif beserta LPS. Makrofag yang teraktivasi menimbulkan respons imun dan memproduksi pelepasan sejumlah mediator inflamasi ke dalam sirkulasi sistemik yang menimbulkan efek sistemik yang muncul selama sepsis.⁴ Mediator anti-inflamasi endogen dilepaskan sebagai respon terhadap infeksi dan mengontrol respon inflamasi sistemik yang berlebihan. Gagalnya keseimbangan antara respon negatif dan positif dari mediator inflamasi ini merupakan faktor kunci yang mempengaruhi kerusakan seluler dan *outcome* klinis.⁵

Peran apoptosis dalam sindroma sepsis dan terjadinya *multiple organ failure/dysfunction syndrome* (MOF/MODS) belum ditemukan secara menyeluruh, tetapi banyak penelitian yang menyebutkan bahwa peningkatan proses apoptosis memiliki peranan penting dalam menentukan *outcome* sindroma sepsis. Pada sepsis, kejadian yang kompleks dapat menyebabkan terjadinya proses apoptosis sehingga mengakibatkan kegagalan multiorgan sebagai respons adaptif seluler. Radiasi ultraviolet, asap rokok, *ozone*, lipopolisakarida dapat mengaktivasi NF- κ B untuk terjadinya apoptosis.⁶⁻⁸

Sepsis menyebabkan kematian yang ekstensif pada limfosit sehingga akan terjadi immunosupresi dan kematian. Patofisiologi sepsis melibatkan apoptosis limfosit yang berlebihan dimana ini akan berhubungan dengan *outcome* yang buruk, dan produksi sitokin yang tidak diinginkan yang akan menyebabkan *injury* pada *host*.⁹⁻¹⁰

Telah dilakukan eksperimen pada hewan percobaan dan dilaporkan bahwa beberapa sel target : timus, lien, plakspeyer, hepar, ginjal, paru, usus dan otot rangka akan mengalami proses apoptosis. Diantara sel target tersebut limfosit terlihat menjadi sel target pre dominan terjadinya apoptosis selama berlangsungnya sepsis. Ini akan menyebabkan menurunnya jumlah limfosit (limfositopenia) pada pulpa putih di lien.¹¹

Pada keadaan sepsis limfosit mengalami aktivasi terutama oleh Interleukin-2 (IL-2) yang berperan sebagai aktivator dan stimulator, tetapi pada konsentrasi berlebih justru akan berperan sebagai *feed back* regulator terhadap sel limfosit T dengan meningkatkan *T Cell Reseptor* (TCR) yang mengaktifkan *Ligand death* (TNF α dan FasL), sehingga limfosit yang mengalami aktivasi lebih mudah mengalami apoptosis dibandingkan limfosit dalam keadaan istirahat.⁶

Pengelolaan induksi dan sedasi merupakan hal penting untuk pasien dalam kondisi sakit kritis.¹² Ketamin suatu antagonis dari reseptor *N*-methyl-D-aspartat, sering digunakan karena mempunyai efek sedasi dan analgesi kuat. Selain itu ketamin terpilih untuk pengelolaan sedasi dan analgesi pada pasien sepsis dan penyakit kritis karena mempunyai efek stimulasi kardiovaskular dan mendukung keadaan hemodinamik yang lebih baik.^{13,14}

Chang Y *et al* melaporkan ketamin mempunyai efek supresif terhadap fungsi makrofag dalam menghasilkan sitokin proinflamasi.¹⁵

Yang J *et al* telah meneliti efek ketamin terhadap endotoksin yang menginduksi *acute lung injury*. Disebutkan bahwa ketamin dosis 5 dan 50 mg/kg menghambat aktivasi NF- κ B, sedangkan dosis 50 mg/kg menghambat peningkatan TNF- α , dan ekspresi IL-6 dan pada tikus yang diberikan endotoksin intravena.¹⁶

Sun J *et al* menyebutkan bahwa ketamin dosis 0,5 mg/kg menekan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α , dan menghambat aktivasi NF- κ B. Pada dosis 5 mg/kg akan menghambat pelepasan IL-6, serta menurunkan mortalitas pada tikus yang mengalami syok septik.¹⁷

Sedangkan Yu Y *et al* melaporkan ketamin secara bermakna menurunkan aktivasi NF- κ B dan menghambat produksi sitokin pada sel mononuklear tikus yang telah terpapar LPS.¹⁸

Oberholzer C *et al* menyebutkan bahwa apoptosis limfosit dapat dicetuskan oleh tidak adanya IL-2 atau dengan dilepaskannya glukokortikoid, granzymes, ataupun TNF- α dan FasL.⁶

Satyawati R melaporkan bahwa ketamin dosis 0,5 mg/kg secara bermakna menurunkan apoptosis kardiomyosit pada mencit yang terpapar LPS.¹⁹

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh ketamin intravena terhadap indeks apoptosis limfosit mencit Balb/c yang terpapar LPS intraperitoneal?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum :

Menganalisis pengaruh ketamin intravena terhadap kejadian apoptosis limfosit pada mencit Balb/c yang terpapar LPS intraperitoneal.

1.3.2. Tujuan Khusus :

1. Menganalisis perbedaan indeks apoptosis limfosit pada mencit yang terpapar LPS intraperitoneal yang diberi ketamin dosis 0,5 ; 5 dan 50 mg/kgBB intravena dibandingkan kontrol
2. Menganalisis perbedaan indeks apoptosis limfosit pada mencit yang terpapar LPS intraperitoneal antara pemberian ketamin dosis 0,5 ; 5 dan 50 mg/kgBB intravena

1.4. Manfaat Penelitian

1. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sumbangan teori dalam upaya menerangkan pengaruh pemberian ketamin terhadap kejadian sepsis.
2. Penelitian ini dapat menjadi landasan untuk penelitian lebih lanjut.

1.5. Originalitas

Chang Y <i>et al</i> (2004)	Ketamin mempunyai efek supresif terhadap fungsi makrofag dalam menghasilkan sitokin proinflamasi. ¹⁵
Yang J <i>et al</i> (2005)	Ketamin menginhibisi peningkatan TNF- α , dan ekspresi IL-6 dan aktivasi NF- κ B pada tikus yang diberikan endotoksin intravena. ¹⁶
Sun <i>et al</i> (2004)	Ketamin menekan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α , dan IL-6, melalui hambatan aktivitas NF- κ B ¹⁷
Yu Y <i>et al</i> (2002)	Ketamin secara bermakna menurunkan aktivasi NF- κ B dan menghambat produksi sitokin pada sel mononuklear tikus yang telah terpapar LPS. ¹⁸
Oberholzer C <i>et al</i> (2001)	Apoptosis limfosit dapat dicetuskan oleh tidak adanya IL-2 atau dengan dilepaskannya glukokortikoid, granzymes, ataupun TNF- α dan FasL. ⁶
Satyawati R (2008)	Ketamin secara bermakna menurunkan indeks apoptosis kardiomyosit mencit yang terpapar LPS. ¹⁹

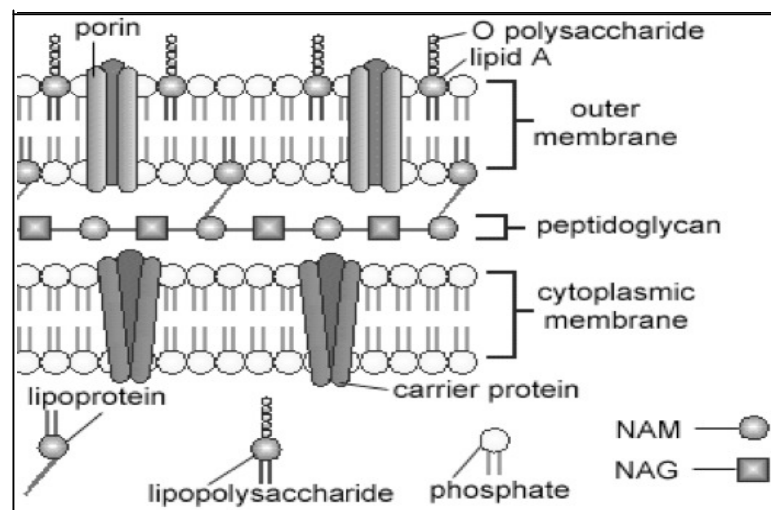
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2. 1.Lipopolisakarida (LPS)

Penyebab dari sepsis terbesar adalah bakteri gram negatif dengan prosentase 60 sampai 70 % kasus, yang menghasilkan berbagai produk dapat menstimulasi sel imun. Sel tersebut akan terpacu untuk melepaskan mediator inflamasi. Produk yang berperan penting terhadap sepsis adalah lipopolisakarida (LPS).²⁰⁻²³

LPS atau endotoksin adalah suatu komponen membran luar dari bakteri gram negatif yang merupakan inisiator awal syok septik. Patofisiologi syok septik sudah banyak diketahui tetapi terapi masih terbatas dan mortalitas pasien syok masih tinggi.^{20,21,24,25}



Gambar 1. Gambar lipopolisakarida²⁶

LPS merangsang peradangan jaringan, demam dan syok pada penderita yang terinfeksi. Struktur lipid A dalam LPS bertanggung jawab terhadap reaksi

dalam tubuh penderita. LPS dalam darah akan berikatan dengan protein darah membentuk *lipopolysaccharide binding protein* (LBP). LBP dapat langsung mengaktifkan sistem imun seluler dan humoral, yang dapat menimbulkan perkembangan gejala septikemia. LBP sendiri tidak mempunyai sifat toksik, tetapi merangsang pengeluaran mediator inflamasi yang bertanggung jawab terhadap sepsis.²¹

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, hiporeaktivitas vaskuler terhadap obat-obat vasokonstriktor, disfungsi miokardium.^{8,27-29}

LPS merupakan faktor patogenik utama pada sepsis gram-negatif, yang ditandai dengan syok, koagulopati, dan disfungsi multiorgan. Sebagai respons terhadap paparan LPS sistemik, sitokin seperti proinflamasi seperti TNF- α , IL-1, dan interferon diproduksi oleh *host*. Produksi sitokin proinflamasi dan induksi mediator yang lebih distal seperti *nitric oxide*, *platelet activation factor* (PAF), dan prostaglandin menyebabkan hipotensi, perfusi organ inadkuat, dan kematian sel yang berhubungan dengan MODS. Status proinflamasi ini didefinisikan sebagai *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), dengan gejala klinis suhu lebih dari 38⁰C atau kurang dari 36⁰C, laju jantung lebih dari 90x/menit, laju pernapasan lebih dari 20 x/menit, leukosit lebih dari 12.000 atau kurang

dari 4000 sel/mm. Sedangkan sepsis adalah SIRS yang disertai infeksi. Pada waktu yang bersamaan, tubuh membentuk sitokin anti inflamasi (IL-10, IL-11, IL-13, dsb). Bila keduanya seimbang akan terjadi homeostasis, bila sitokin pro inflamasi lebih dominan akan terjadi SIRS. Pada keadaan sitokin anti inflamasi dominan akan terjadi supresi system imun sampai anergi yang rentan terhadap infeksi, yang disebut dengan *compensatory anti inflammatory responss syndrome* (CARS). Induksi sistem imunitas dapatan secara besar-besaran ini dapat dan seringkali menimbulkan efek katastrofik pada pasien dengan sindroma sepsis.³⁰

Sepsis ditandai dengan hilangnya keseimbangan homeostatik dan disfungsi endotel, penurunan fungsi sistem kardiosirkulasi dan homeostasis intraseluler. Hipoksi seluler dan apoptosis dapat berakibat pada disfungsi dan kematian organ.³⁰ Sepsis dengan hipoperfusi menyebabkan MODS, seperti oliguria, asidosis laktat, dan penurunan fungsi mental, dan/atau hipotensi yang mengacu pada keadaan syok septik dan memiliki prognosis yang buruk.³¹

2.2. Hubungan LPS dengan apoptosis

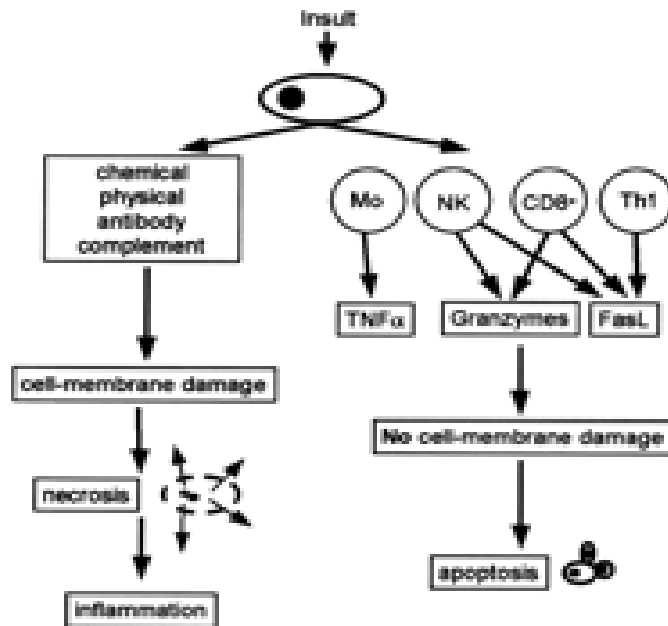
Syok septik pada binatang coba menunjukkan bahwa apoptosis, suatu proses seluler aktif kematian sel di bawah kontrol genetik, yang mengacu kerusakan organ primer. Pemberian LPS sistemik pada mencit menyebabkan apoptosis sel endothelial pada beberapa jaringan. Penghambatan TNF- α oleh antibodi anti-TNF atau TNF-*binding protein* menurunkan angka apoptosis karena induksi LPS, menimbulkan dugaan

bahwa TNF- α merupakan mediator utama kematian sel apoptosis karena pemberian LPS sistemik.^{28,29,32}

LPS memacu apoptosis pada sel epithelial gastrointestinal dan limfosit, sel endothelial glomerulus, dan jantung. Neutrofil memegang peranan penting dalam pertahanan *host* menyerang patogen, tetapi juga menyebabkan trauma endotel, yang ditandai dengan peningkatan permeabilitas vaskuler, edema paru, dan kematian sel. Neutrofil diduga memacu kematian sel apoptotik pada sel epitel bronkus manusia. Pada penelitian *in vitro* mengenai kerusakan jaringan karena LPS menunjukkan bahwa LPS dapat secara langsung memacu sel endotel mengalami apoptosis.^{29,32}

2.3. Apoptosis

Suatu rangsangan dapat menimbulkan terjadinya nekrosis atau apoptosis. Sel dapat mati melalui dua cara yaitu dengan mekanisme rusaknya membran sel oleh karena trauma kimia, fisika, komplemen, antibodi yang berakhir menjadi nekrosis seluler dan melalui mekanisme kematian sel yang terprogram (apoptosis) yang disebabkan oleh TNF- α atau FasL yang diproduksi oleh makrofag (Mo), sel T sitotoksik (CD8), atau sel T helper (Th1). Lebih jauh lagi sel T sitotoksik (CD8) atau sel *natural killer* (NK) dapat menyebabkan apoptosis pada sel target melalui lepasnya granzyme.⁶



Gambar 2. Jalur terjadinya nekrosis dan apoptosis.⁶

Apoptosis adalah suatu kematian terprogram. Apoptosis adalah proses seluler normal yang bermanfaat dalam perbaikan dan/atau pembentukan jaringan. Selama apoptosis, sel mengalami mekanisme bunuh diri seluler non-nekrotik, berlawanan dengan nekrosis, pada umumnya tidak menimbulkan inflamasi dan trauma pada jaringan. Sel yang mengalami apoptosis ditandai dengan fragmentasi DNA, kondensasi kromatin, membran mengalami pembengkakan, sel mengerut, dan berakhir dengan vesikel dengan membran tertutup.⁶

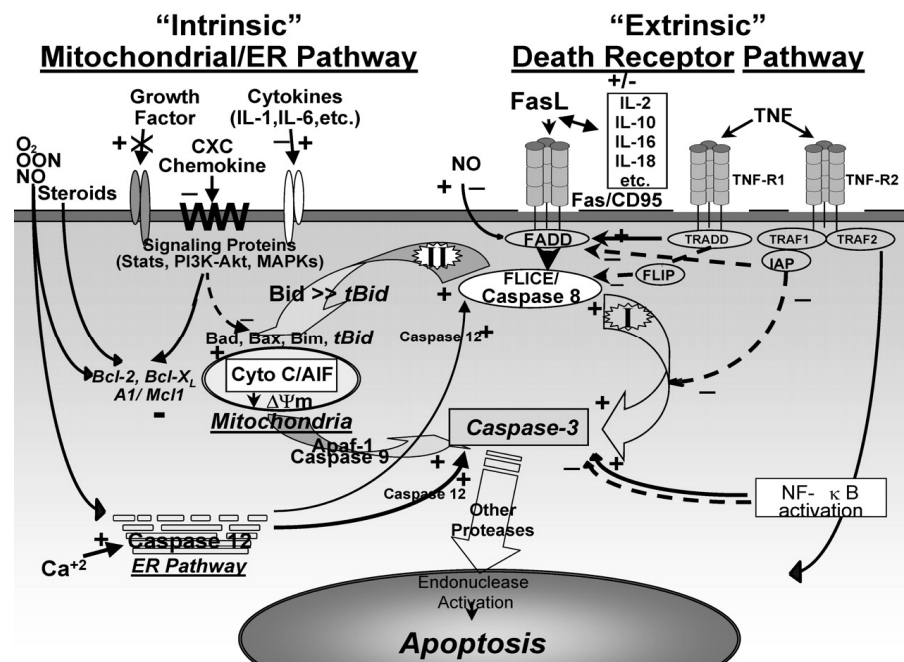
Kematian sel apoptotik terjadi terutama melalui tiga jalur yang berbeda : jalur reseptor kematian ekstrinsik (sel tipe I), jalur intrinsik (mitokondrial) (sel tipe II), dan jalur terinduksi stress atau *reticulum endoplasmic* (ER).³¹⁻³³ Fas antigen (diferensiasi sel antigen 95 (CD95)) merupakan protein permukaan sel yang dimiliki oleh membran reseptor superfamili TNF, yang responsif terhadap sinyal apoptosis ekstrinsik pada

sel tipe I. Fas terekspresi pada berbagai tipe sel, seperti timosit, sel B teraktivasi, sel T, monosit, makrofag, neutrofil, dan juga berbagai sel non-imun pada hepar, paru, dan jantung.⁷

Di saat reseptor TNF famili, seperti Fas, terikat pada ligannya, seperti FasL akan menyebabkan trimerisasi dan membentuk formasi *death-induced signaling complex* (DISC), melibatkan suatu molekul adaptor yang juga mengandung death domain yaitu FADD, yang mengikat death domain yang teraktivasi tersebut dan juga mengikat prokaspase 8 melalui *death effector domain* untuk membentuk DISC. *Death signal* kemudian ditransmisikan dari DISC menjadi kaskade caspase arus rendah. Di saat prokaspase 8 terpecah dan teraktivasi menjadi kaspase 8 aktif, dapat memecah dan mengaktifkan kaspase efektor arus rendah, seperti kaspase 3, yang memecah inhibitor *caspase-activated DNase* dan memecah DNA di dalam nukleus, dan terjadilah apoptosis. Jalur apoptotik dapat disupresi oleh inhibitor seperti FLIP, IAP-2, Crm A, and p35.⁷

Sedangkan jalur sel tipe II bekerja melalui mitokondria yang melepaskan molekul destruksi sel, dan sejumlah kecil DISC yang terbentuk. lain dengan jalur death receptor ekstrinsik, awal dari kerja jalur intrinsik belum banyak diketahui. Jalur ini diaktivasi oleh hilangnya growth factor seperti IL-2, IL-4, atau *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*, penambahan sitokin seperti IL-1 dan IL-6, atau stressor eksogenik seperti steroid, *reactive oxygen intermediates* (ROIs), peroksinitrit, atau NO, yang akan mengaktivasi anggota pro- atau antiapoptotik dari Bcl-2 *family*, seperti t-Bid atau Bax yang diduga mengalami translokasi dari sitosol, yang secara normal ada pada keadaan

diam, menuju ke membrane mitokondria, di mana akan mengalami penurunan $\Delta\Psi_m$. Kemudian mitokondria melepaskan sitokrom c, Smac/Diablo, dan apaf-1, yang melalui formasi apoptosom, mengaktifasi kaspase arus rendah seperti kaspase 9. Kaspase arus rendah ini menyebabkan kematian sel. Jika anggota Bcl-2 family dalam keadaan seimbang, maka sel dapat bertahan hidup.⁷

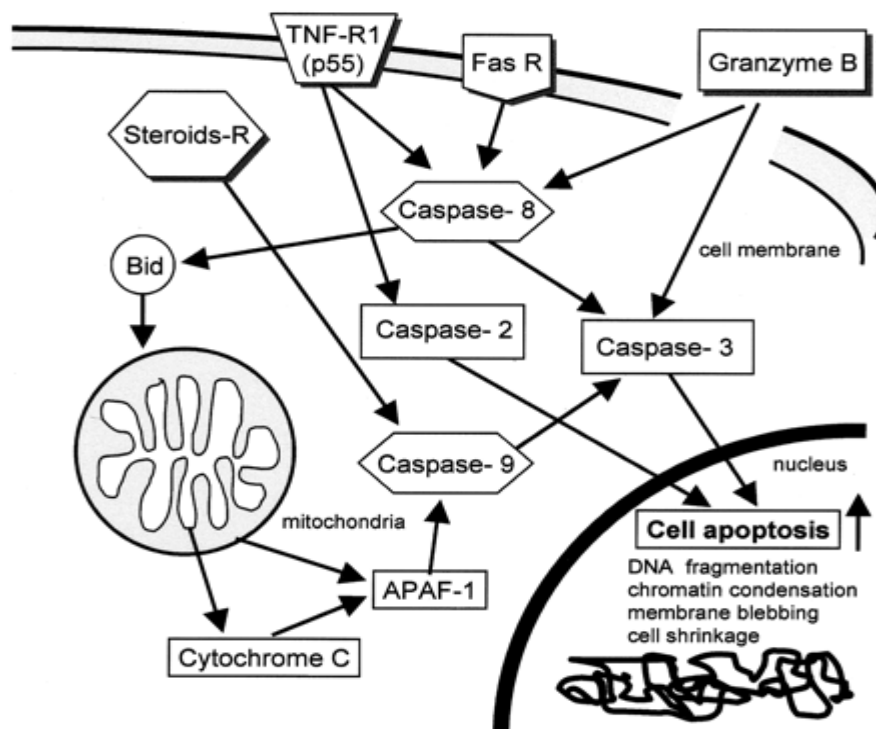


Gambar 3. Jalur sinyal apoptosis secara luas, melalui jalur sinyal ekstrinsik dan intrinsik.⁷

Tidak seperti jalur apoptosis melalui TNF- α atau FasL dimana memerlukan caspase 8, jalur glukokotikoid yang mengaktifasi caspase 3 nampaknya tergantung dari aktivasi caspase 9. Bukti-bukti bahwa caspase 9 mengaktifasi caspase 3 merupakan jalur yang terpisah sendiri dari caspase 8, berasal dari penelitian fibroblast embrionik caspase 9 pada tikus yang dimatikan.⁶

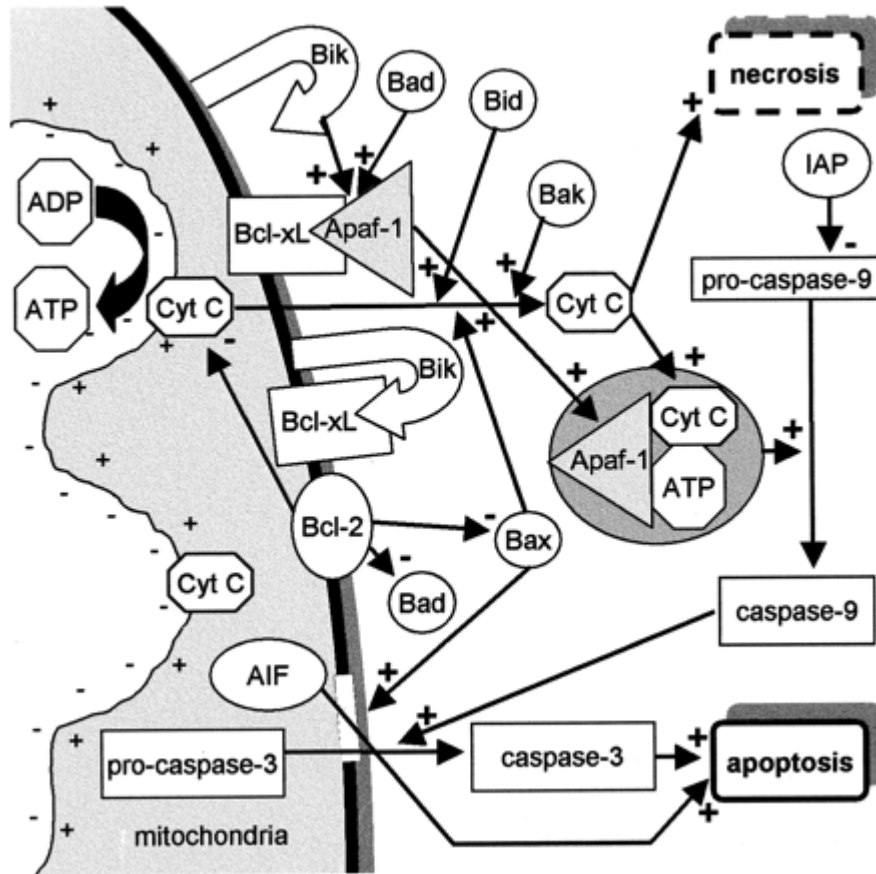
Apoptosis sel dapat dicetuskan melalui aktivasi caspase 2 ataupun caspase 2. Caspase 2 diaktivasi melalui reseptor 1 TNF- α (TNF-R1), sedangkan caspase 3

diaktivasi oleh granzyme B atau secara tidak langsung oleh steroid, TNF-R1, reseptor Fas (Fas R) atau jalur mitokondria melalui aktivasi caspase 9.⁶



Gambar 4. Jalur apoptosis melalui TNF-R1, Fas R, Granzyme, Steroid.⁶

Protein family Bcl-2 juga berperan penting dalam apoptosis melalui jalur mitokondria. Anggota family Bcl-2 menunjukkan pengaruh pro dan anti apoptosis dengan cara dimerisasi satu sama lain. Tergantung dari stimulus (Bid, Bik, Bax, Bad, Bak), sitokrom c (Cyt C), *apoptosis-inducing factor* (AIF) dan procaspase 3 dilepaskan dari mitokondria ke dalam sitoplasma sel. Ini akan berakibat aktivasi dari procaspase 9 dan caspase 3 dimana keduanya akan mencetuskan apoptosis. Tergantung dari jumlah sitokrom c yang tersedia dan kuantitas inhibitor caspase, sel dapat berlanjut menjadi nekrosis ataupun apoptosis.⁶



Gambar 5. Jalur apoptosis melalui peranan mitokondria.⁶

2.3.1. Aktivasi NF- κ B

Telah diketahui secara luas bahwa LPS mengaktivasi faktor transkripsi respons stres NF- κ B dan memacu sekresi mediator inflamasi oleh makrofag seperti TNF- α , dan IL-1. Faktor transkripsi nuclear NF- κ B penting dalam ekspresi berbagai gen di mana protein berperan dalam kontrol apoptosis, dalam pembentukan sel B dan T, dalam respons anti viral dan bakterial, dalam respons terhadap stress, dalam perkembangan embrio dan respons inflamasi. Regulasi NF- κ B yang tidak benar dapat menyebabkan inflamasi dan kelainan autoimun, infeksi viral, dan kanker. Anggota famili NF- κ B yang sudah teridentifikasi

adalah NF- κ B1 atau p50, NF- κ B2 atau p52, RelA atau p65, RelB, dan c-Rel.
6,28,35

NF- κ B dapat diaktivasi oleh berbagai stimuli, seperti sitokin (seperti TNF- α , dan IL-1), mitogen sel T dan B, protein virus, dan pemacu stress (seperti *reactive oxygen species* atau radiasi ultra violet). Produk aktivasi NF- κ B meliputi sitokin proinflamasi (messenger molecule) penting untuk aktivasi leukosit, TNF, NOS, dan bahkan regulasi tonus vaskuler, ekspresi molekul adesi sel dalam respons inflamasi, dan aktivasi viral seperti pada HIV.^{13,35}

Radiasi ultraviolet, asap rokok, ozon, dan stimuli lain yang mengaktivasi NF- κ B yang dimediasi oleh produksi ROS. NF- κ B dalam sitosol berbentuk kompleks trimerik. Protein P50/P65 dimer dihubungkan dengan inhibisi protein yang disebut I- κ B. Tingginya sinyal aktivasi seperti terikatnya TNF- α , pada reseptornya dan oksidan memacu perubahan dalam sel yang menyebabkan terjadinya fosforilasi subunit I- κ B oleh IKK (I κ B kinase). Kemudian terjadilah degradasi I κ B melalui sistem ubiquitin. Setelah I- κ B terfosforilasi, suatu proses digesti proteolitik subunit ini teraktivasi. Di saat subunit inhibitor dislidged dari P60/P65 heterodimer aktivator NF- κ B bermigrasi ke nukleus dan berikatan dengan DNA, yang merupakan awal dari transkripsi. Oksidan dapat diatasi dengan antioksidan yang memodulasi aktivasi NF- κ B.^{21,28}

2.3.2. Apoptosis sel limfosit

Pada SIRS terjadi peningkatan TNF- α , FasL, dan Glukokortikoid, peningkatan tersebut akan mengakibatkan meningkatnya apoptosis sel. Peningkatan sitokin-sitokin ini akan menginduksi sel menjadi apoptosis. Pada sel-

sel limfosit juga akan mengalami apoptosis, hal ini terjadi karena adanya sitokin-sitokin ligan penyebab apoptosis (*death cytokin*), seperti *Fas Ligand* (FasL), dan TNF- α . Pada sepsis, limfosit mengalami aktivasi terutama oleh IL-2, di mana limfosit yang sudah teraktifasi ini lebih mudah mengalami induksi apoptosis dibandingkan limfosit dalam keadaan istirahat (*resting cell*). Peran IL-2 pada limfosit adalah sebagai stimulator proliferasi dan juga sebagai aktifator, tetapi pada konsentrasi yang berlebih, justru akan berperan sebagai feedback regulator sel limfosit-T, yaitu dengan meningkatnya *T-Cell Receptors (TCR) engaged* sel limfosit-T terhadap *death ligand*.^{21,36-38}

Pada populasi sel limfosit T CD8 aktivasi induksi apoptosis lebih banyak dilakukan oleh FasL melalui reseptor TNF-R1, dan pada populasi limfosit T CD4 aktivasi induksi apoptosis lebih banyak dilakukan oleh Fas (CD95) dan FasL.⁹ Di mana akan terjadi aktivasi Caspase inaktif menjadi Caspase aktif.³⁶⁻³⁸

Efek yang ditimbulkan oleh IL-2 adalah memacu perkembangan sel T dari fase G1 ke fase sintesa, merangsang tahap sintesa IL-2 selanjutnya oleh sel T dalam waktu 24 jam setelah teraktivasi akan merangsang pembentukan sitokin lain yaitu *interferon* gamma dan limfotoksin, juga meningkatkan sintesa p55 yaitu reseptor IL-2 sendiri, meningkatkan pertumbuhan dan fungsi sitolitik sel-NK dan CTL.

2.3.3. Uji TUNEL (TdT-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling).

Tanda pasti biokemikal dari apoptosis adalah degradasi dari genom DNA, suatu peristiwa ireversibel dimana sel diprogram untuk mati dan terjadi sebelum adanya perubahan permeabilitas membran plasma. Di banyak sistem, fragmentasi DNA ini menunjukkan hasil dari aktivasi endogen Ca^{2+} dan Mg^{2+} , suatu

endonuklease nuklear dependen. Enzim ini secara selektif akan memecah DNA yang terletak diantara unit-unit nukleosom , sehingga akan menghasilkan fragmen-fragmen DNA baik mono maupun oligonukleosom. ⁴⁶

Degradasi DNA yang ekstensif merupakan peristiwa khas yang terjadi pada tahap awal apoptosis. Pemecahan DNA dapat menghasilkan rantai ganda, fragmen DNA LMW (mono dan oligonukleosom) seperti halnya rantai tunggal yang putus pada DNA HMW. Putusnya rantai-rantai DNA tersebut dapat dideteksi oleh enzim yang berlabel free 3-OH termini dengan modifikasi nukleotida (fluorescein-dUTP) dengan terminal deoksinukleotida transferase (TdT). Metode labeling yang terakhir, biasa kita sebut TUNEL (TdT-mediated fluorescein-dUTP nick end labeling). ^{46,47}

2.4. Peranan lien pada proliferasi limfosit

Lien merupakan kumpulan jaringan limfoid terbesar dalam organisme. Karena banyak mengandung sel fagositik maka lien merupakan alat pertahanan penting terhadap mikroorganisme yang masuk sirkulasi. Selain itu lien merupakan satu-satunya organ yang mempunyai kemampuan menyaring darah, sehingga lien memiliki fungsi sistem imun dan sistem hematopoetik. ³⁹

Fungsi dalam sistem imun antara lain sebagai tempat produksi limfosit, produksi antibodi, dan pemindahan antigen dari darah. Sedangkan fungsi sistem hematopoetik yaitu pembentukan sel darah fetus, destruksi eritrosit dan platelet yang sudah tua, rusak, dan abnormal dalam sinus venosus pulpa merah , serta sebagai tempat penyimpanan eritrosit (reservoir) yang elastis dan terkendali yang mampu mengeluarkan sel darah ke dalam sirkulasi serta menyesuaikan volume sirkulasi. ³⁹

Lien berwarna merah keunguan karena banyak menyimpan darah, lunak, dan mudah ruptur. Lien dibungkus oleh sebuah simpai jaringan ikat padat yang menjulurkan trabekula yang membagi parenkim atau pulpa lien menjadi kompartemen-kompartemen.³⁹ Lien juga mengandung banyak limfosit dan kaya akan suplai makrofag yang memonitor darah. Strukturnya terdiri atas serat, sel retikular meshwork, serta kapsul fibrosa dan trabekula yang mengandung myofibroblast, yang bersifat kontraktil.³⁹

Parenkim lien terdiri atas :

a. Pulpa Merah

Pulpa merah terdiri atas bangunan memanjang yaitu *korda Bilroth* yang terdapat diantara sinusoid. Pulpa merah mengandung sel plasma, makrofag, trombosit, granulosit, dan limfosit. Trombosit dan eritrosit tua, rusak, atau abnormal dihancurkan (hemocatheresis). Eritrosit dihancurkan oleh sel fagositik dan besi yang berasal dari hemoglobin disimpan dalam sel. Besi akan dikeluarkan bila diperlukan untuk pembentukan hemoglobin baru.⁴⁰

b. Pulpa Putih

Pulpa putih tersusun atas jaringan limfoid yang menyelubungi arteri sentralis yang disebut *periarteriolar lymphoid sheath (PALS)* dan nodulus limfatikus yang ditambahkan pada selubung.^{39,40} Sel limfosit T ditemukan disekitar arteri sentralis, sedang sel limfosit B terdapat pada nodulus limfatikus.⁴⁰ Bila terdapat benda asing dalam darah maka akan merangsang limfosit T dan limfosit B untuk menghasilkan zat anti.³⁹

2.5. Ketamin

Ketamin telah dikenal lebih dari 30 tahun, namun baru dalam beberapa tahun belakangan dapat diterima secara lebih luas dalam praktek anestesi. Ketamin ditemukan oleh Stevens dari Detroit dan dicobakan pada sukarelawan di penjara Michigan pada tahun 1964. Ketamin mulai digunakan untuk anestesi pada tahun 1965 oleh Domino dan Corssen. Sejak Domino dan Corssen melaporkan penggunaan klinis pertama ketamin, maka telah banyak penelitian klinis dan laboratorium yang dilakukan.⁴¹

Ketamin adalah analgesik poten pada konsentrasi subanestetik dalam plasma, dan efek analgesik dan anestetiknya mungkin diperantarai oleh berbagai mekanisme. Secara spesifik, analgesia mungkin disebabkan oleh interaksi antara ketamin dengan reseptor opioid didalam sistem saraf pusat.^{41,44} Ketamin juga berinteraksi dengan reseptor *N-methyl-D-aspartate* (NMDA), reseptor monoaminergik, reseptor muskarinik, dan kanal Ca^{2+} .^{13,41,44,45}

Induksi dan pengelolaan sedasi merupakan hal penting untuk pasien dalam kondisi sakit kritis di ruang rawat intensif (ICU).¹² Ketamin suatu antagonis dari reseptor *N-methyl-D-aspartat*, sering digunakan karena mempunyai efek sedasi dan analgesi kuat. Selain itu ketamin terpilih untuk pengelolaan sedasi dan analgesi pada pasien sepsis dan penyakit kritis karena mempunyai efek stimulasi kardiovaskular dan mendukung keadaan hemodinamik yang lebih baik.¹⁶

Ketamin telah disarankan untuk anestesi pada keadaan endotoksemia dan pasien sakit kritis karena efek stimulasi kardiovaskular. Ketamin memiliki keistimewaan berupa indeks terapeutik yang tinggi, stabilitas kardiovaskuler, kecukupan ventilasi spontan dan tetap utuhnya refleks-refleks laringeal dan

faringeal.^{40,41} Ketamin meningkatkan *cardiac output* dan *systemic vascular resistance*, melalui stimulasi sistem saraf simpatis, yang menghasilkan pelepasan katekolamin.⁴² Kontraktilitas miokard secara klinis meningkat oleh pemberian ketamin sebagai hasil stimulasi simpatomimetik melalui sistem syaraf pusat dan aktifitas baroreseptor dan inhibisi uptake katekolamin neuronal⁴³

Sangat berbeda dengan hampir semua anestetik lain, ketamin menstimulasi sistem kardiovaskuler. Efek kardiovaskuler indirek ini disebabkan oleh stimulasi sentral terhadap sistem saraf simpatis. Tekanan darah arteri pulmonalis dan sistemik, laju jantung, curah jantung, kerja jantung, dan kebutuhan oksigen miokard meningkat. Karena alasan ini maka ketamin harus dihindari pada pasien yang mempunyai penyakit arteri koroner, hipertensi yang tidak terkontrol, gagal jantung kongestif, dan aneurisma arterial. Efek depresan miokard langsung dari ketamin dosis besar terlihat melalui blokade simpatis (misalnya transeksi medulla spinalis) atau habisnya simpanan katekolamin (misalnya syok berat tahap akhir). Sebaliknya, efek stimulasi tidak langsung ketamin seringkali bermanfaat pada pasien yang mempunyai syok hipovolemik akut.⁴¹

Pada hewan yang mengalami syok, ketamin berkaitan dengan tingkat survival yang lebih tinggi dibandingkan dengan hewan yang dianestesi dengan halothan. Tekanan darah mungkin dipertahankan dengan lebih baik pada hewan yang mengalami perdarahan yang dianestesia dengan ketamin, tetapi terjadi kenaikan yang lebih besar pada konsentrasi laktat arteri dibandingkan hewan yang mempunyai tekanan darah arteri lebih rendah yang dianestesi dengan anestetik yang lebih reaktif. Ini menunjukkan tidak adekuatnya perfusi jaringan walaupun tekanan darah dipertahankan dengan ketamin. Diperkirakan, vasokonstriksi yang diinduksi ketamin mempertahankan tekanan darah dengan mengorbankan perfusi

jaringan. Pasien yang dalam keadaan kritis kadang merespons ketamin dengan penurunan tak terduga pada tekanan darah dan curah jantung, ini mungkin menunjukkan deplesi simpanan katekolamin dan telah lelahnya mekanisme kompensasi sistem saraf simpatis, yang mengakibatkan efek depresan miokard oleh ketamin tidak dapat diatasi.^{41,44}

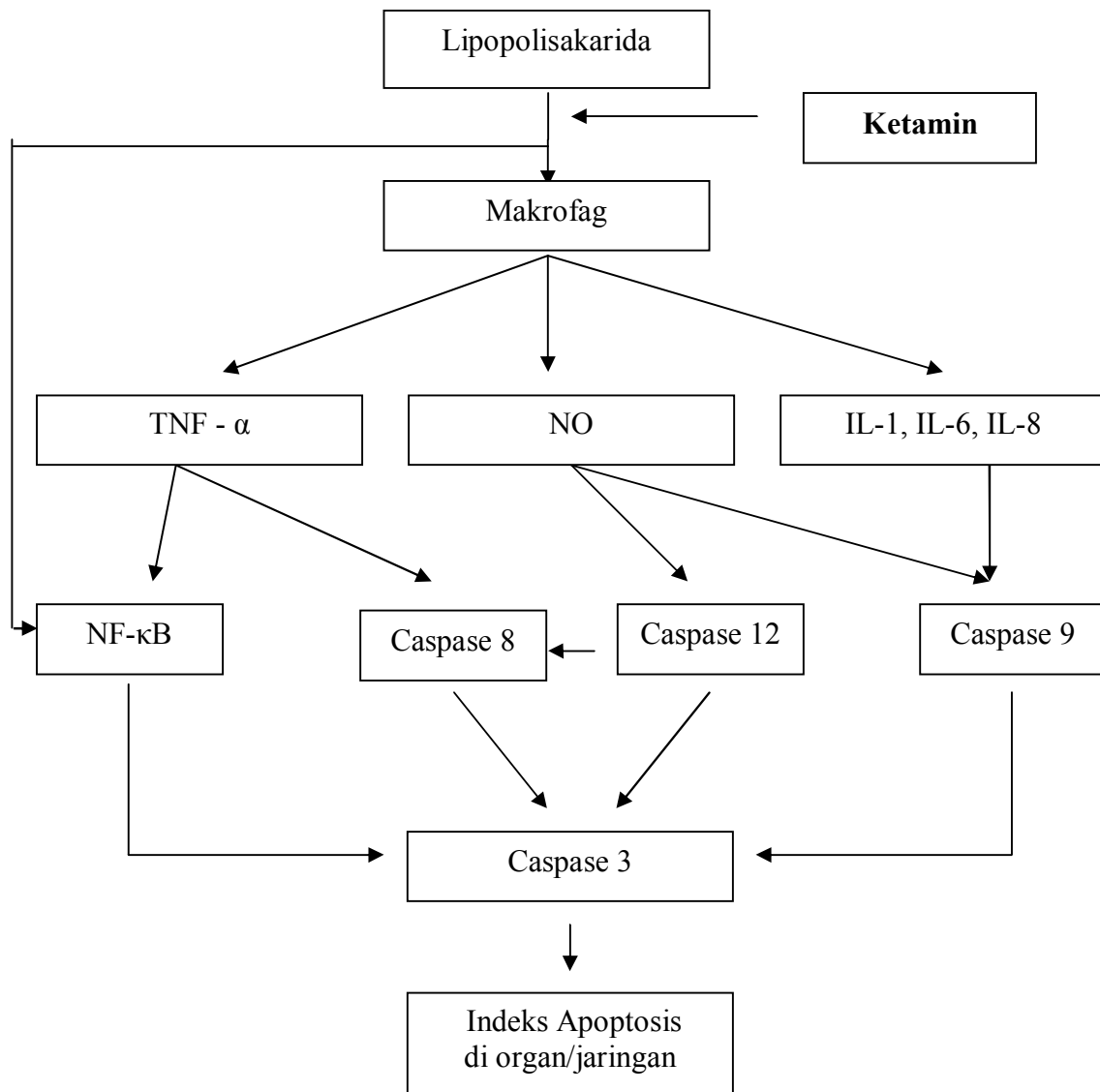
Efek analgesi yang kuat dapat ditimbulkan dengan memberikannya pada dosis subanestetik, sedangkan pada dosis yang lebih tinggi secara intravena dapat digunakan untuk induksi anestesi. Efek analgesik dan amnestik ketamin disebabkan oleh ikatan pada reseptor NMDA jika ketamin diberikan pada dosis yang kecil (0,1 – 0,5 mg/kgBB).^{41,42}

Pada penelitian Chang Y *et al*, tahun 2004 mengenai efek supresif ketamin terhadap fungsi makrofag, ketamin menekan fungsi fagositosis, kemampuan oksidatifnya, dan produksi sitokin, kemungkinan melalui reduksi potensial membran mitokondrial selain efek toksisitas langsung terhadap sel.¹⁵ Ketamin pada paparan LPS akan mensupresi produksi TNF- α , IL-6 dan IL-8 dan *rhTNF-induced* IL-6 dan IL-8 dalam darah manusia. TNF- α adalah sitokin pertama yang timbul setelah stimulasi LPS, yang kemudian menstimulasi sekresi IL-6 dan IL-8 dari makrofag monosit, neutrofil, dan sel endothelial. Diduga efek supresi ketamin pada produksi IL-6 dan IL-8 akibat LPS mungkin disebabkan efek inhibisi ketamin pada produksi TNF- α yang diinduksi oleh LPS.^{15,44}

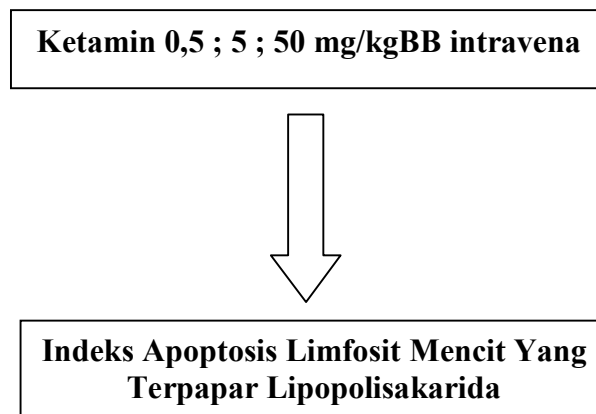
Yang J *et al*, tahun 2005 telah meneliti efek ketamin terhadap endotoksin yang menginduksi *acute lung injury*. Disebutkan bahwa ketamin menginhibisi peningkatan TNF- α dan ekspresi IL-6 dan aktivasi NF- κ B pada tikus yang diberikan endotoksin intravena.¹⁶

Satyawati R, tahun 2008 melaporkan bahwa ketamin dosis 0,5 mg/kg secara bermakna menurunkan apoptosis kardiomyosit mencit yang terpapar LPS.¹⁹

Sedangkan Yu Y *et al* , tahun 2002, melaporkan ketamin secara bermakna menurunkan aktivasi NF- κ B dan menghambat produksi sitokin pada sel mononuklear tikus yang telah terpapar LPS.¹⁸

BAB 3**KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS****3.1.Kerangka Teori**

3.2. Kerangka Konseptual



3.3. Hipotesis

1. Pemberian ketamin intravena akan menyebabkan indeks apoptosis limfosit mencit yang terpapar LPS lebih rendah dibandingkan dengan kontrol.
2. Pemberian ketamin dosis 50 mg/kgBB akan menyebabkan indeks apoptosis limfosit mencit yang terpapar LPS lebih rendah dibandingkan dengan dosis 0,5 dan 5 mg/kgBB.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk eksperimental laboratorik yang dilakukan secara acak tersamar ganda, dengan tujuan mencari pengaruh pemberian ketamin intravena pada mencit Balb/c yang terpapar LPS intraperitoneal terhadap indeks apoptosis limfosit.

Kelompok dibagi menjadi 4 yaitu kelompok kontrol (K), Perlakuan 1 (P1), Perlakuan 2 (P2) dan Perlakuan 3 (P3)

Pembagian kelompok perlakuan :

K : Kelompok kontrol ; mencit Balb/c yang diberi LPS intraperitoneal

P1: Kelompok perlakuan 1, mencit Balb/c yang diberi LPS intraperitoneal
Mendapat ketamin 0,5 mg/kgBB intravena

P2: Kelompok perlakuan 2, mencit Balb/c yang diberi LPS intraperitoneal
Mendapat ketamin 5 mg/kgBB intravena

P3: Kelompok perlakuan 3, mencit Balb/c yang diberi LPS intraperitoneal
Mendapat ketamin 50 mg/kgBB intravena

Sesuai dengan penelitian sebelumnya, dosis obat yang diberikan disetarakan dengan dosis pada manusia dengan berat badan 70 kg, dikalikan dengan konstanta uji terapi pada hewan coba (mencit) yaitu 0,0026. Dosis ketamin yang diberikan 0,5-2 mg/kg x 0,0026 sehingga didapatkan dosis pada mencit 3,64-14,56 mg/kg. Diambil dosis sedang 5 mg/kg, dosis rendah 0,5 mg/kg, dan dosis besar 50 mg/kg.

Jadi dosis obat ketamin yang diberikan pada masing-masing kelompok adalah ketamin 0,0125 mg (0,5 mg/kg x 0,025) ; 0,125 mg (5 mg/kg x 0,025) ; dan 1,25 mg (50 mg/kg x 0,025).

4.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian : 30 hari

Tempat penelitian : Laboratorium Parasitologi dan Patologi Anatomi
Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada
Yogyakarta

4.3. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi : Mencit Balb/c

Sampel : Mencit Balb/c yang diberi LPS intraperitoneal yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi

4.4. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.4.1. Kriteria Inklusi

Mencit Balb/c jantan.

Umur dua sampai dua setengah bulan

Berat badan 25-30 gram.

4.4.2. Kriteria Eksklusi

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

4.5. Besar Sampel

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 ekor.⁴⁸ Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan 20 ekor, masing-masing 5 ekor untuk tiap kelompok.

4.6. Randomisasi

20 mencit Balb/c dikelompokkan secara random menjadi 4 kelompok yaitu:

Kelompok K : 5 mencit Balb/c

Kelompok P1 : 5 mencit Balb/c

Kelompok P2 : 5 mencit Balb/c

Kelompok P3 : 5 mencit Balb/c

4.7. Variabel Penelitian

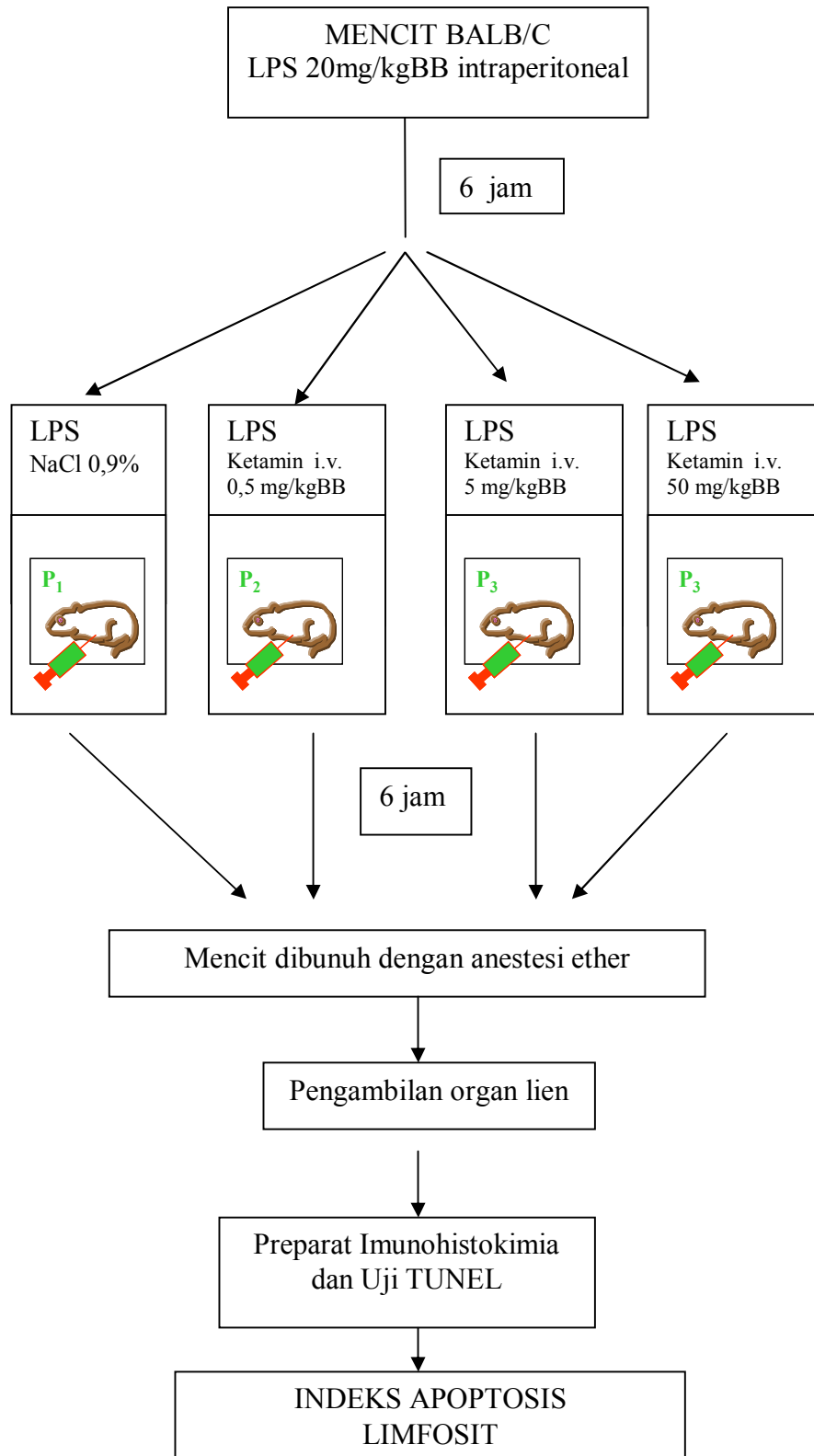
4.7.1. Variabel Bebas

Pemberian ketamin

4.7.2. Variabel Tergantung

Indeks apoptosis limfosit

4.8. Kerangka Kerja Penelitian



4.9. Definisi Operasional

- Lipopolisakarida (LPS) atau endotoksin adalah suatu komponen membran luar dari bakteri gram negatif berasal dari E.coli yang diberikan 20 mg/kgBB intraperitoneal
- Ketamin adalah obat anestesi sedasi dan analgesi diberikan dalam dosis 0,5 dan 5 , 50 mg/kgBB intravena.
- Indeks apoptosis yaitu jumlah sel apoptotik yang diwarnai dengan metode TUNEL tiap 100 sel pada 10 lapangan pandang dari tiap preparat, kemudian diambil rerata hasilnya. .

4.10. Bahan dan Alat Penelitian

4.10.1. Keperluan untuk penyuntikan LPS dan ketamin

1. Alkohol 70%
2. S spuit 3 ml
3. Mencit Balb/c

4.10.2. Reagen untuk pemeriksaan histopatologi rutin

1. Phosphat buffer formalin 10%
2. Alkohol 70%, 80%, 90%, absolute
3. Xylol
4. Parafin cair
5. Albumin dan Poly-L-Lysine
6. Canada balsam dan Entelan

4.10.3. Reagen untuk uji TUNEL

1. Bahan Label TUNEL dengan TdT

Enzim TUNEL 5 μ l (Boehringer Mannheim, Biochemicals 1767305) dicampur dengan 45 μ l campuran label TUNEL (Boehringer Mannheim, Biochemicals 1767291). Pertahankan dengan es.

2. Larutan Rnase

Rnase 10 μ l (Dnase-free, 500 μ g/ml) di dilusikan dalam 1 ml PBS. Konsentrasi akhir 5 μ g/ml.

3. Larutan propidium iodide (PI)

1 μ l dari 10 mg/ml PI dalam 10 ml 0,1% sodium sitrat p 7,0. Konsentrasi akhir 1 μ m/ml.

4.10.4. Alat untuk pengamatan dan dokumentasi sediaan

1. 1 unit Multi Head Microscope fluoresens
2. Nikon Digital Net Camera DN 100 + SD card
3. 1 unit personal computer Intel Pentium Processor

4.11. Cara Kerja

4.11.1. Prosedur pembuatan preparat histopatologi secara umum

- a. Fiksasi

Potongan jaringan organ dimasukkan ke dalam larutan formalin buffer (larutan formalin 10% dalam buffer Natrium Phosphat samapi mencapai pH 7,0). Setelah fiksasi selesai, jaringan dimasukkan dalam larutan aquadest selama 1 jam untuk proses penhlilangan larutan fiksasi

- b. Dehidrasi

Potongan jaringan dimasukkan dalam alcohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alcohol-xylol selama 1 jam dan kemudian laritan xylol murni selama 2 x 2 jam

- c. Impregnansi

Jaringan dimasukkan dalam paraffin cair selama 2x2 jam

d. Embedding

Jaringan ditanam dalam paraffin padat yang mempunyai titik lebur 56-58 C, ditunggu sampai paraffin padat. Jaringan dalam paraffin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyek yang sebelumnya telah diolesi polisilin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyek dipanaskan dalam incubator suhu 56-58 C sampai paraffin mencair.

4.11.2. Prosedur uji TUNEL

- Jaringan yang sudah difiksasi dengan air yang steril dan terdistilasi dilakukan rehidrasi
- Cairan yang berlebihan digoyangkan
- Ditambahkan 50 µl campuran label TUNEL dengan TdT
- Ditutup dengan *coverslip* berbahan silikon (12 mm φ)
- Diinkubasi 30 menit pada suhu 37 C dalam ruang basah
- Dilakukan pembilasan slide 3 kali dengan PBS
- Cairan yang berlebihan digoyangkan lagi
- Dilakukan inkubasi slide dengan larutan Rnase selama 30 menit pada suhu 37 C
- Dibilas slide 3 kali dengan PBS
- Diinkubasi slide 10 menit pada suhu ruang dalam larutan PI
- Cairan yang berlebihan digoyangkan
- Kemudian ditutup dengan *coverslide* 18 mm φ dan Immu-Mount

- Dilakukan observasi slide dengan mikroskop fluoresens

4.11.3. Menghitung Indeks Apoptosis

Perhitungan sel yang mengalami apoptosis (TUNEL positif : nukleus limfosit yang mengalami apoptosis) dihitung per 100 sel dengan pembesaran 400 kali, pada 10 lapangan pandang dari tiap preparat, dalam satu blok parafin kemudian diambil reratanya. Lapangan pandang dimulai dari kiri ke kanan, kemudian ke bawah, dimulai dari kiri lagi. Pengukuran dilakukan oleh 2 orang yaitu peneliti dan ahli Patologi Anatomi, dengan *Clinical Agreement* 95%.

Skala variable : rasio

4.12. Cara Pengumpulan Data

Masing-masing kelompok dilakukan pemeriksaan indeks apoptosis limfosit.

Didapat data rerata dari indeks apoptosis limfosit organ lien.

4.13. Analisis Data

Setelah data terkumpul dilakukan *data cleaning*, *coding* dan tabulasi. Analisa data meliputi analisis deskriptif dalam bentuk rerata, SD, median dan grafik dan uji hipotesis. Pada variabel bebas didapatkan skala pengukuran nominal yaitu diberi ketamin dan tidak diberi ketamin. Sedang pada variabel terikat untuk indeks apoptosis didapatkan skala pengukuran rasio. Data yang didapat, diuji normalitas. Pada distribusi normal, diuji beda dengan metode *ANOVA*, jika hasilnya ada perbedaan dilanjutkan *post hoc*. Pada distribusi tidak normal, diuji beda dengan metode Kruskal Wallis, dilanjutkan metode Mann-Whitney jika hasilnya terdapat perbedaan.

BAB 5

HASIL PENELITIAN

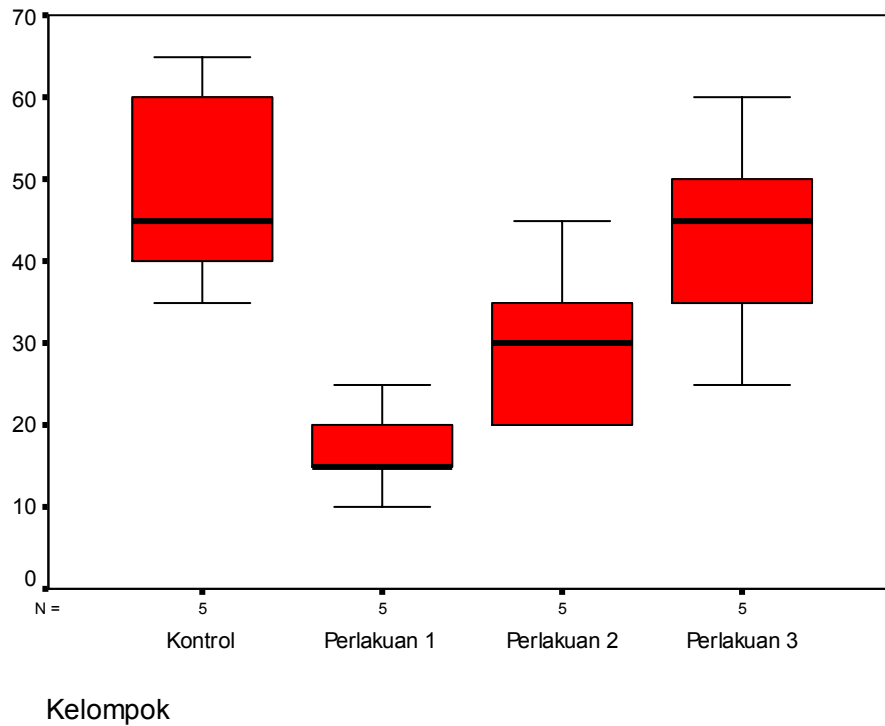
Dua puluh mencit yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi diberikan perlakuan yang sama, disuntikkan LPS intraperitoneal. Enam jam setelah pemberian LPS, dilakukan pemberian ketamin intravena melalui vena ekor lateral tanpa adanya kesulitan. Dua puluh mencit terlihat sakit, yang ditandai dengan penurunan aktivitas dan nafsu makan, serta piloereksi.³²

Uji normalitas dengan teknik Shapiro-Wilk menunjukkan distribusi data normal ($p > 0,05$). Analisa deskriptif menunjukkan bahwa rerata dan median indeks apoptosis limfosit pada keempat kelompok perlakuan lebih rendah daripada kelompok kontrol.

Tabel 1. Rerata indeks apoptosis pada Limfosit

Kelompok	Rerata \pm SD	Median
LPS	49,00 \pm 12,94	45
LPS + Ketamin 0,5 mg/kg	17,00 \pm 5,70	15
LPS + Ketamin 5 mg/kg	30,00 \pm 10,61	30
LPS + Ketamin 50 mg/kg	43,00 \pm 13,51	45

Tabel 1 menunjukkan bahwa rerata indeks apoptosis limfosit pada kelompok P1 (LPS + Ketamin 0,5 mg/kg) lebih rendah dibanding ketiga kelompok yaitu kelompok K (LPS), kelompok P2 (LPS + Ketamin 5 mg/kg), dan kelompok P3 (LPS + Ketamin 50 mg/kg). Sedangkan kelompok kontrol menunjukkan rerata yang paling tinggi dibandingkan ketiga kelompok lainnya.



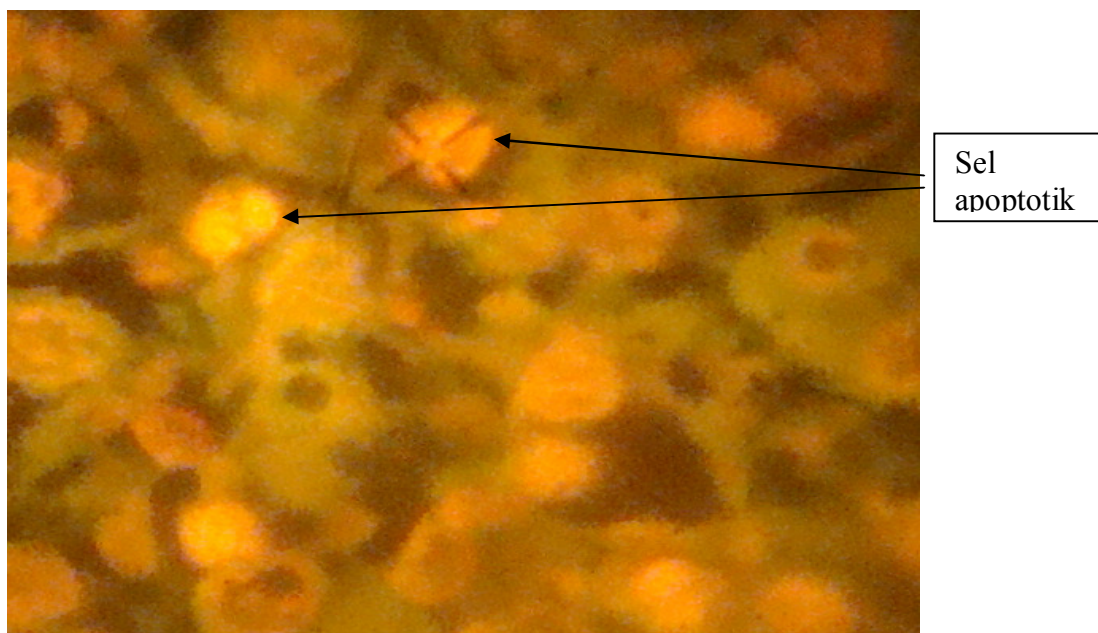
Gambar 6 . Grafik *box-plot* indeks apoptosis limfosit

Dari Grafik Box-plot terlihat bahwa rerata indeks apoptosis limfosit kelompok P1 (LPS + Ketamin 0,5 mg/kg), P2 (LPS + Ketamin 5 mg/kg), dan P3 (LPS + Ketamin 50 mg/kg) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok K (LPS).

Tabel 2. Uji beda indeks apoptosis pada limfosit

Kelompok Perlakuan	Kemaknaan
Kontrol terhadap	
P1	p = 0,002
P2	p = 0,680
P3	p = 0,829
P1 terhadap	
P2	p = 0,288
P3	p = 0,010
P2 terhadap	
P3	p = 0,288

Pada Tabel2, uji beda dengan ANOVA menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$) dalam keempat kelompok. Dari analisa post hoc, didapatkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok K dengan P1 ($p = 0,002$ atau $p < 0,05$). Sedangkan uji beda antara K dengan P2 dan antara K dengan P3 menunjukkan adanya perbedaan tidak bermakna, di mana $p > 0,05$.



Gambar 7. Gambar apoptosis dengan metode Tunel

BAB 6

PEMBAHASAN

Induksi dan pengelolaan sedasi merupakan hal penting untuk pasien dalam kondisi kritis, baik di ruang rawat intensif maupun di kamar operasi. Ketamin sering digunakan karena mempunyai efek sedasi dan analgesi yang cukup kuat. Selain itu ketamin terpilih untuk pengelolaan sedasi dan analgesi pada pasien sepsis dan penyakit kritis karena mempunyai efek stimulasi kardiovaskular dan mendukung keadaan hemodinamik yang lebih baik. Ketamin meningkatkan *cardiac output* dan *systemic vascular resistance*, melalui stimulasi sistem saraf simpatis, yang menghasilkan pelepasan katekolamin.⁴⁵ Beberapa penelitian pada tikus menyebutkan bahwa pemberian ketamin dapat menekan pembentukan sitokin yang meningkat akibat pemberian LPS.³³

Apoptosis memegang peranan penting dalam homeostasis seluler, dengan menjaga keseimbangan antara proliferasi sel dengan kematian sel. Data penelitian terbaru menunjukkan bahwa apoptosis memegang peranan penting dalam beberapa penyakit, di antaranya sepsis. Salah satu mekanisme yang menyebabkan kematian sel adalah aktivasi kaspase. Dari penelitian binatang coba, pemberian anti TNF- α dan kaspase inhibitor memiliki efek terapeutik dalam menekan apoptosis.¹⁶

Dari hasil penelitian didapatkan adanya rerata indeks apoptosis limfosit lebih rendah pada ketiga kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Adanya perbedaan tersebut dipengaruhi dosis ketamin, namun hanya kelompok P1 (Ketamin 0,5 mg/kg) yang memiliki indeks apoptosis limfosit lebih rendah yang bermakna ($p=0,002$ atau $p<0,05$). Sedangkan pada kelompok P2 (Ketamin 5 mg/kg

) dan P3 (Ketamin 50 mg/kg) tidak terdapat indeks apoptosis limfosit lebih rendah yang bermakna ($p > 0,05$) dibandingkan kelompok kontrol.

Hasil tersebut sesuai dengan beberapa penelitian sebelumnya yaitu penelitian oleh Yang et al yang menyebutkan bahwa ketamin menghambat peningkatan TNF- α , dan ekspresi IL-6 dan aktivasi NF- κ B. Penelitian oleh Yu et al juga melaporkan ketamin secara bermakna menurunkan aktivasi NF- κ B dan menghambat produksi sitokin pada sel mononuklear tikus yang telah terpapar LPS. Sementara itu penelitian secara in vitro pada manusia oleh Kawasaki et al menemukan bahwa ketamin menekan produksi TNF- α , IL-6, dan IL-8. Dengan terhambatnya aktivitas NF- κ B maka proses apoptosis juga terhambat, tampak dari penurunan indeks apoptosis. Penurunan kadar TNF- α menunjukkan adanya penurunan reaksi imunologis tubuh terhadap sepsis. Penghambatan TNF- α oleh antibodi anti-TNF atau TNF-*binding protein* menurunkan angka apoptosis karena induksi LPS.^{28,29,32}

Indeks apoptosis limfosit yang lebih rendah tidak bermakna terlihat pada kelompok P2 (Ketamin 5 mg/kg) dan P3 (Ketamin 50 mg/kg). Kemungkinan ketamin pada dosis tersebut telah menyebabkan reoksigenasi dan pengembalian suplai oksigen yang lebih banyak daripada dosis 0,5 mg/kg.

Pada mencit yang telah terpapar LPS kemungkinan telah terjadi keadaan hipoksia. Pemberian ketamin dosis 5 dan 50 mg/kg terjadi depresi napas sehingga proses hipoksia akan bertambah. Bila proses hipoksia terus berlanjut akan mengakibatkan iskemik 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 terjadi nekrosis dan apoptosis walaupun telah terjadi reperfusi kembali melalui peningkatan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Selain itu, pada

sel yang mengalami iskemia reperfusi terjadi penurunan perlindungan antioksidan dalam sel.³⁵

Ketamin dapat menginduksi vasokonstriksi pembuluh darah untuk mempertahankan tekanan darah dalam memperbaiki perfusi jaringan (reperfusi). Kerusakan oleh karena reperfusi merupakan bagian dari respon inflamasi dari jaringan yang rusak. Sel-sel darah putih dibawah ke area tersebut dengan darah balik yang baru melepaskan faktor-faktor inflamasi seperti interleukin sama halnya radikal bebas pada respon kerusakan jaringan. Kembalinya aliran darah akan membawa sejumlah oksigen yang berlebihan ke dalam sel yang akan merusak protein sel, DNA, dan membran plasma. Kerusakan membran sel akhirnya dapat menyebabkan pelepasan radikal bebas yang lebih banyak. Beberapa ROS dapat juga bertindak secara tidak langsung dalam signaling untuk terjadinya apoptosis. Leukosit juga dapat mengumpul pada kapiler kecil, menjadi obstruksi dan menyebabkan iskemia.⁴⁹

Reperfusion injury mempunyai arti kerusakan jaringan yang disebabkan saat kembalinya aliran darah ke jaringan setelah periode iskemia. Tidak adanya oksigen dan nutrisi dari darah menciptakan kondisi dimana pemulihan sirkulasi menghasilkan kerusakan inflamasi dan oksidatif melalui induksi dari *oxydative stress* daripada pemulihan fungsi yang normal.⁴⁹ Bila jaringan berada pada suatu kondisi iskemia, beberapa kejadian kimia akan dimulai sampai terjadinya disfungsi seluler dan nekrosis. Bila iskemia berakhir dengan pemulihan aliran darah, akan terjadi peristiwa lainnya yang menyebabkan *injury* tambahan. Maka, dimana terjadi penurunan atau gangguan aliran darah yang menyebabkan *injury*, disitu ada dua komponen yaitu *direct injury* yang terjadi selama periode iskemik dan *indirect* atau *reperfusion injury* yang mengikutinya.^{49,50}

Pada iskemia yang diperpanjang (60 menit atau lebih), *hipoxanthine* dibentuk sebagai hasil dari pemecahan metabolisme ATP. Enzim *xanthine dehydrogenase* bertindak sebagai *reverse*, dan dihasilkan *xanthine oxidase* sebagai hasil dari ketersediaan oksigen yang tinggi. Oksidasi ini menyebabkan molekul oksigen diubah menjadi *superoxide* dan *hydroxyl radicals* yang sangat reaktif. *Xanthine oxidase* juga menghasilkan asam urat dimana bertindak sebagai pro oksidan dan pencetus terjadinya spesies reaktif seperti peroksinitrit. *Nitric oxide* berlebihan yang dihasilkan selama periode reperfusi akan bereaksi dengan *superoxide* untuk menghasilkan peroksinitrit, suatu spesies reaktif yang poten. Beberapa radikal bebas dan ROS akan menyerang lipid sel membran, protein dan glikosaminoglikan, sehingga menyebabkan kerusakan yang lebih parah. Mediator-mediator penting lain 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 .^{50,51}

Mekanisme terpicunya apoptosis dan terbentuknya *inhibitors*, pada keadaan normal terdapat dalam keseimbangan. Apabila pemicunya sangat kuat dan *inhibitors* kurang atau terlambat pembentukannya, terjadilah apoptosis. Sebaliknya apabila *inhibitors* lebih dominan, maka apoptosis tidak mudah terjadi. Sehingga hal yang sangat berpengaruh pada proses apoptosis adalah seberapa hebat hipoksia dan reperfusi yang mengikutinya.⁴⁸

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

1. Pemberian ketamin intravena menyebabkan indeks apoptosis limfosit mencit yang terpapar LPS intraperitoneal lebih rendah dibandingkan dengan kontrol
2. Pemberian ketamin dosis 0,5 mg/kg menyebabkan indeks apoptosis limfosit mencit yang terpapar LPS intraperitoneal lebih rendah dibandingkan dengan dosis 5 dan 50 mg/kgBB intravena.

7.2 Saran

1. Pemberian ketamin 0,5 ; 5 ; 50 mg/kg intravena dapat digunakan pada kondisi sepsis oleh karena tidak menyebabkan indeks apoptosis limfosit lebih tinggi.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan pada kisaran dosis $< 0,5 - 5$ mg/kg untuk mengetahui dimana dosis efektif ketamin mulai menurunkan indeks apoptosis limfosit yang bermakna pada mencit yang terpapar LPS.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mitchell M, Levy. Sepsis. The Institute for Healthcare Improvement (IHI): Cambridge, Massachusetts. <http://www.ihl.org/IHI/Topics/CriticalCare/Sepsis/>
2. Vincent JL, Abraham E, Annane D, Bernard G, Rivers E, Greet V B. Reducing mortality in sepsis: new directions. *Critical Care* 2005;6(3):S1-S18. <http://ccforum.com/content/6/S3/S1>
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003 ; 348:1546–54
4. Angus D, Linde-Zwirble W, Lidicker J. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001 ;. 29 :1303-10
5. Baptiste E. Cellular Mechanisms in sepsis. *Journal of Intensive Care Medicine* 2007 ; 22 : 63-72
6. 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.
7. Doreen E, Wesche, Joanne L, Neira L, Perl M. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *Journal of Leukocyte Biology* 2005 ; 78:325-37.
8. Abbas AK. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Company. 2006 ; 175-85.

9. Bommhard U, Chang KC, Swanson PE, Wagner TH, Tinsley KW, Karl IE, et al. Akt decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *The Journal of Immunology*. 2004, 172 : 7583-91.
10. Weaver JG, Rouse MS, Steckelberg JM, Badley AD. Improved survival in experimental sepsis with an orally administered inhibitor of apoptosis. *The FASEB Journal*. 2004, 18 : 1185-91.
11. Cunha, Burke A., MD. "Sepsis, Bacterial." Talavera F, Weiss EL editors. *Infectious Diseases*. September 2004 ; 10 : 6163-5.
12. Tsuchiya M, Asada A, Maeda K, et al. Propofol versus Midazolam regarding their antioxidant activities. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2001; 163 ; 26-31
13. Edrich T, Friedrich AD, Eltzschig HK, Felbinger TW. Ketamine for Long-Term Sedation and Analgesia of a Burn Patient. *Anesthesia Analgesia*. 2004;99:893-5
14. Ostermann ME, Keenan SP, Seiferling RA, Sibbald WJ: Sedation in the intensive care unit: a systematic review. *JAMA*. 2000 ; 283 : 1451-9.
15. Chang Y, Chen T, Sheu J, Chen R. Suppressive effects of ketamine on macrophage functions. *Journal of Toxicology and Applied Pharmacology* 2004 ; 204 : 27- 35
16. 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;54:133-7

17. Sun J, Feng F, Chen J, Xu J. Ketamin suppresses endotoxin-induced NF- κ B and cytokines production in the intestine. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 2004 ; 48 : 317-21
18. Yu Y, Zhou Z, Xu J, Liu Z, Wang Y. Ketamin reduces NF- κ B activation and TNF α production in rat mononuclear cell induced by lipopolysaccharide In Vitro. *Annal of Clinical and Laboratory Science* 2002;32: 292-98.
19. Satyawati R. Pengaruh pemberian ketamin intravena terhadap indeks apoptosis kardiomyosit mencit balb/c yang terpapar lipopolisakarida intraperitoneal. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.2008
20. Ismanoe G. The Role of Cytokine in The Pathobiology of sepsis. National Symposium : The 2nd Indonesian Sepsis Forum. Surakarta 2008
21. Guntur HA. SIRS dan Sepsis.(Imunologi, Diagnosis, Penatalaksanaan). Sebelas Maret University Press. Edisi pertama 2006
22. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis : A New hypothesis of pathogenesis of the disease Process. *Chest* 1997 ; 12 : 235-43
23. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992 ; 101 : 1644-55
24. Paterson RL, Webster NR. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. *R.Coll.Surg.Edinb* 2000;178-182.
25. Hotchkiss SR, Karl EI. The Pathophysiology and treatment of sepsis. 2003; 348:138-50.

26. Wilson K, Henry G, Parillo JE. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. 2003 ; 10 : 10-25.
27. Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, Eichacker PQ, Hoffman WD, Kuo GC, et al. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med* 1989. 169 ; 823–32.
28. Wright G, Singh IS, Hasday JD, Farrance1 IK, Hall G, Cross AS, and Rogers TB. Endotoxin stress-responce in cardiomyocytes: NF- κ B activation and tumor necrosis factor- α expression *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. USA. 2002 ; 282 : 872-9.
29. Witzembichler B, Westermann D, Knueppel S, Schultheiss HP, Tschöpe C. Protective role of angiopoietin-1 in endotoxic shock. *Circulation* 2005; 111 : 97-105.
30. Grutkoski PS, Chung CS, Albina J, Biffi W, Ayala A. Apoptosis in critically ill. In: Fink MP, Abraham E, Vincent JL, Kochanek PM. *Textbook of Critical Care*. 5th ed. Philadelphia:Elsevier Saunders 2005; 195-9.
31. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990 ;113 : 227–42
32. Juanita HJ, Vernooy JHJ, Mieke A. Dentener, Suylen RJ, Wim A, Buurman, Wouters EFM. Intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice induces apoptosis in bronchial epithelial cells .No role for tumor necrosis factor- α and infiltrating neutrophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 2001; 24: 569-76.
33. Peter ME, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003; 10: 26-35.

34. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116 :205-19
35. Gill C, Mestril R, samali A. Losing heart : the role of apoptosis in heart disease-a novel therapeutic target?. *FASEB J.*2002; 16 : 135
36. Roitt IM. *Immunology*, 8th ed. Barcelona: Times Miror International; 1994. p. 21-8
37. Kresno SB. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*, edisi ke 3. Penerbit FK UI Jakarta 96. 2002 : 72-7
38. 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.
39. Junqueira LC, Arneiro j, Kelley RO. *Basic Histology*. 8th ed. Prentice Hall International inc London.1995 : 423
40. Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. *Buku Ajar Histologi*. Edisi 5. Jakarta : EGC; 1996. pp 291-303.
41. Stoelting RK, Hillier SC. *Pharmacology & Physiology in Anesthetic Practice*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2006.
42. Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ, Larson CP. Nonvolatile anesthetic agents. In : Morgan GE, Mikhail MS, Murray MJ, Larson CP. *Clinical Anesthesiology* 3rd ed. New York : Lange Medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Edition 2002 ;164.
43. Miller RD. *Anesthesia*. 6th edition. Philadelphia Churchill Livingstone 2005; 240– 4

44. White PF, Way WL, Trevor AJ. Ketamine – its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology* 1982; 56: 119–36.
45. Lundy PM, Gverzdy S, Frew R. Ketamine: evidence of tissue-specific inhibition of neuronal and extraneuronal catecholamine uptake process. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63 : 298–303.
46. Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A., Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation,. *J. Cell Biol* 1992 ; 119 : 493
47. Moe GW, Marin J, Konig A, Goldenthal M, Lu X, Feng Q. In vivo TNF- α inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. *AJP- Heart Circulatory Physiology*. 2004 ; 287:1813-20
48. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. New York: World Health Organization 1993 ;44
49. Clark, Wayne M. Reperfusion Injury in Stroke. eMedicine. WebMD. 2005.
50. Bushman B. Cellular Injury and Death. Pathology first week. 2000 ; 1-4.
51. Sakamoto A, Ohnishi S, Ogawa R. Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. *Brain Res*. 2001 ; 554 : 186-92.

DATA PRIMER

Indeks apoptosis kelompok kontrol dan perlakuan

Kontrol	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
40	25	35	60
35	15	20	50
65	15	20	45
45	10	30	35
60	20	45	25

HASIL UJI STATISTIK

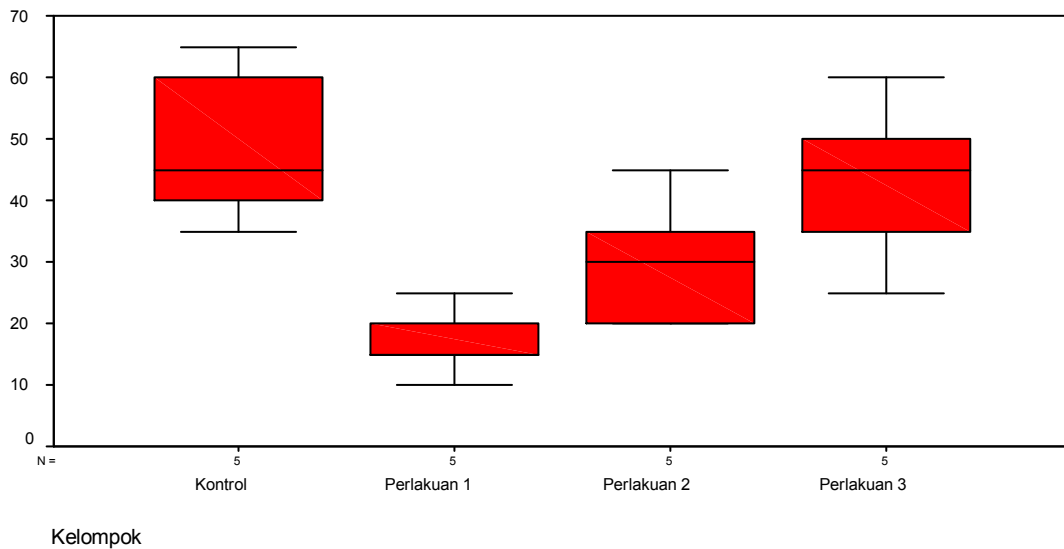
Descriptives				Statistic	Std. Error			
Apop	Kontrol	Mean		49.00	5.788			
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	32.93				
				Upper Bound	65.07			
		5% Trimmed Mean		48.89				
		Median		45.00				
		Variance		167.500				
		Std. Deviation		12.942				
		Minimum		35				
		Maximum		65				
		Range		30				
		Interquartile Range		25.00				
		Skewness		.363	.913			
		Kurtosis		-2.413	2.000			
		Perlakuan 1		Mean		17.00	2.550	
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	9.92		
						Upper Bound	24.08	
				5% Trimmed Mean		16.94		
				Median		15.00		
				Variance		32.500		
				Std. Deviation		5.701		
Minimum				10				
Maximum				25				
Range				15				
Interquartile Range				10.00				
Skewness				.405	.913			
Kurtosis				-.178	2.000			
Perlakuan 2				Mean		30.00	4.743	
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	16.83		
						Upper Bound	43.17	
				5% Trimmed Mean		29.72		
				Median		30.00		
				Variance		112.500		
				Std. Deviation		10.607		
		Minimum		20				
		Maximum		45				
		Range		25				
		Interquartile Range		20.00				
		Skewness		.524	.913			
		Kurtosis		-.963	2.000			
		Perlakuan 3		Mean		43.00	6.042	
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	26.23		
						Upper Bound	59.77	
				5% Trimmed Mean		43.06		
				Median		45.00		
				Variance		182.500		
				Std. Deviation		13.509		
Minimum				25				
Maximum				60				
Range				35				
Interquartile Range				25.00				
Skewness				-.183	.913			
Kurtosis				-.681	2.000			

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Apop Kontrol	.221	5	.200*	.915	5	.501
Perlakuan 1	.237	5	.200*	.961	5	.814
Perlakuan 2	.227	5	.200*	.910	5	.468
Perlakuan 3	.159	5	.200*	.990	5	.980

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

a. Lilliefors Significance Correction



ANOVA

Apop

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3043.750	3	1014.583	8.199	.002
Within Groups	1980.000	16	123.750		
Total	5023.750	19			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Apop

	(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Kontrol	Perlakuan 1	32.00*	7.036	.002	11.87	52.13
		Perlakuan 2	19.00	7.036	.068	-1.13	39.13
		Perlakuan 3	6.00	7.036	.829	-14.13	26.13
	Perlakuan 1	Kontrol	-32.00*	7.036	.002	-52.13	-11.87
		Perlakuan 2	-13.00	7.036	.288	-33.13	7.13
		Perlakuan 3	-26.00*	7.036	.010	-46.13	-5.87
	Perlakuan 2	Kontrol	-19.00	7.036	.068	-39.13	1.13
		Perlakuan 1	13.00	7.036	.288	-7.13	33.13
		Perlakuan 3	-13.00	7.036	.288	-33.13	7.13
	Perlakuan 3	Kontrol	-6.00	7.036	.829	-26.13	14.13
		Perlakuan 1	26.00*	7.036	.010	5.87	46.13
		Perlakuan 2	13.00	7.036	.288	-7.13	33.13
Bonferroni	Kontrol	Perlakuan 1	32.00*	7.036	.002	10.83	53.17
		Perlakuan 2	19.00	7.036	.095	-2.17	40.17
		Perlakuan 3	6.00	7.036	1.000	-15.17	27.17
	Perlakuan 1	Kontrol	-32.00*	7.036	.002	-53.17	-10.83
		Perlakuan 2	-13.00	7.036	.499	-34.17	8.17
		Perlakuan 3	-26.00*	7.036	.012	-47.17	-4.83
	Perlakuan 2	Kontrol	-19.00	7.036	.095	-40.17	2.17
		Perlakuan 1	13.00	7.036	.499	-8.17	34.17
		Perlakuan 3	-13.00	7.036	.499	-34.17	8.17
	Perlakuan 3	Kontrol	-6.00	7.036	1.000	-27.17	15.17
		Perlakuan 1	26.00*	7.036	.012	4.83	47.17
		Perlakuan 2	13.00	7.036	.499	-8.17	34.17

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