RESEARCH ARTICLE

METODE UCAO (UNILATERAL CEREBRAL ARTERY OCCLUSION) MENINGKATKAN KADAR MMP-9 JARINGAN OTAK PADA MODEL TIKUS STROKE ISKEMIK

UCAO (UNILATERAL CEREBRAL ARTERY OCCLUSION) METHOD INCREASES THE LEVEL OF MMP-9 BRAIN TISSUE IN RATS MODEL OF ISCHEMIC STROKE

Muhamad Rasjad Indra*, Cakra Parindra Gasmara**

*Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

**Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

pISSN : 2407-6724 • eISSN : 2442-5001 • <http://dx.doi.org/10.21776/ub.mnj.2016.002.02.1> • MNJ.2016;2(2):47-51

• Received 25 October 2015 • Reviewed 25 December 2015 • Accepted 25 January 2016

ABSTRAK

Latar belakang. UCAO (Unilateral Cerebral Artery Occlusion) adalah metode penginduksian stroke dengan mengikat arteri carotid selama 45 menit yang akan membuat kondisi hipoksia di jaringan otak sama seperti stroke pada manusia. Prosedur ini tidak rumit dan lebih ekonomis dibandingkan dengan metode yang ada lainnya. MMP-9 adalah marker stroke yang dapat dideteksi menggunakan ELISA melalui serum darah hewan coba.

Tujuan. Membuktikan bahwa metode UCAO yang dilakukan selama 45 menit dapat meningkatkan kadar MMP-9 tikus model stroke iskemik.

Metode. Eksperimen murni di laboratorium secara in vivo dengan metode *randomized post test controlled group design*. 8 tikus wistar jantan umur 8-10 minggu dibagi menjadi 2 kelompok. Sehari setelah induksi stroke dilakukan, kadar MMP-9 diukur dengan mengambil darah ekor melalui ELISA.

Hasil. Dalam penelitian ini, metode UCAO mampu meningkatkan kadar MMP-9 darah tikus kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini dibuktikan dengan hasil uji statistik Mann-Whitney dan Kruskal-Wallis yang signifikan ($p < 0.05$).

Simpulan. Metode induksi stroke UCAO dapat dilakukan sebagai metode untuk membuat tikus model stroke iskemik.

Kata kunci: Stroke iskemik, tikus model stroke iskemik, metode induksi stroke iskemik, UCAO, MMP-9

ABSTRACT

Background. UCAO (Unilateral Cerebral Artery Occlusion) is a stroke induction method by ligating mice's carotid artery for 45 minutes. Thus giving a hypoxic condition similar to stroke attacks to human. This method is less complicated and far more efficient. MMP-9 is a stroke marker which is assayed by ELISA from the blood of test animal.

Objective. To prove UCAO method is capable to raise MMP-9 concentration in mice's blood.

Methods. This research was an experimental laboratory research with post-test only controlled group design. 8 male rats (8-10 weeks) were divided into 2 groups. A day after the treatment group had been induced to stroke, both group were tested to measure the MMP-9 blood concentration through ELISA.

Results. In this research, UCAO method had increased MMP-9 blood concentration in treatment group, compared to the control group. It is proved by the statistic tests, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis, which showed a significant increase in treatment group ($p < 0.05$).

Conclusion. UCAO method is accepted as a method to create an ischemic stroke mice model.

Keywords: Ischemic stroke, ischemic stroke mice model, ischemic stroke induction method, UCAO, MMP-9

PENDAHULUAN

Stroke merupakan penyakit yang ditandai dengan hilangnya sirkulasi darah ke area otak secara tiba-tiba dan mengakibatkan penurunan fungsi neurologis.¹ Stroke merupakan penyebab kecacatan permanen nomor 1 di seluruh dunia. Ada 15 juta penderita stroke di dunia setiap tahunnya, 5 juta diantaranya meninggal dan 5 juta lainnya hidup dengan disabilitas jangka panjang. Jumlah penderita stroke di Indonesia terbanyak dan menduduki urutan pertama di Asia.² Selama lima tahun terakhir, penderita stroke yang meninggal dunia sejumlah 15,4 % dari total populasi, dimana 42,9% merupakan akibat dari stroke iskemik.³

Stroke iskemik terjadi bila pembuluh darah yang memasok darah ke otak tersumbat oleh gumpalan darah,⁴ sehingga sel-sel di daerah injury tidak menerima oksigen dan glukosa yang dibutuhkan. Neuron (sel-sel saraf otak) berhenti berfungsi dan mati kecuali jika aliran darah dipulihkan dengan cepat.⁵ Kematian neuron mengakibatkan defisit fungsi neurologis primer, yang manifestasinya adalah berkurangnya kemampuan untuk melakukan aktivitas fungsional seperti berpakaian dan berjalan.⁶ Gejala yang terjadi pada penderita stroke iskemik tergantung pada area otak mana yang berhenti menerima darah. Penderita dapat mengalami kehilangan salah satu penglihatan, kesulitan berbicara, membaca, atau menulis, kelemahan, dan kelumpuhan ekstremitas, serta kesulitan dalam memori. Gejala-gejala ini dapat menetap dan menyebabkan disabilitas jangka panjang serta penurunan fungsi ADL (*activity daily living*).⁵

Pengobatan stroke yang masih digunakan sekarang adalah anti-platelet, anti-koagulan, dan trombolitik. Ketiga obat ini meringankan gejala stroke dengan melisiskan thrombus yang biasanya menjadi penyebab tersumbatnya arteri di otak. Sehingga aliran darah di otak menjadi normal kembali. Tetapi, ketiga obat ini tidak memiliki fungsi untuk memperbaiki jaringan otak yang sudah rusak karena tidak adekuatnya suplai oksigen ke otak.⁷ Hal ini menyiratkan peluang yang besar dalam pengembangan terapi stroke di masa depan.

Perkembangan dan penelitian untuk stroke penting dilakukan karena prevalensinya yang kian meningkat bersamaan dengan penyakit degeneratif lainnya seperti hipertensi, diabetes

mellitus, dan penyakit jantung koroner. Riset epidemiologi yang dilakukan Global Burden of Disease Project tahun 2008, mengungkapkan 10 hingga 15 tahun ke depan prevalensi penyakit degeneratif akan lebih tinggi dari penyakit infeksi yang disebabkan bakteri maupun parasite. Tahun 2030 diperkirakan prevalensi penyakit degeneratif adalah 87% dari semua masalah kesehatan, dan stroke merupakan salah satu masalah yang utama.

Metode-metode yang telah dikembangkan untuk membuat tikus model stroke sangat beragam. Menginduksi keadaan hipoksia secara sistemik dapat mempengaruhi jaringan otak sama seperti stroke. Menginduksi stroke di lobus otak yang spesifik juga dapat dilakukan dengan photothrombosis. Metode photothrombosis baik dilakukan apabila ingin menginduksi stroke di salah satu hemisfer otak. Tetapi, fasilitas yang dibutuhkan belum tersedia secara bebas. Dengan keterbatasan fasilitas penelitian stroke di Indonesia, diperlukan metode penginduksian stroke yang lebih mudah dilakukan, namun sama efektifnya dengan metode lain.

UCAO (Unilateral Cerebral Artery Occlusion) adalah metode penginduksian stroke dengan cara mengikat arteri carotid, arteri yang langsung mengalirkan darah menuju otak, selama 45 menit.⁸ Ini dilakukan untuk menghasilkan kondisi hipoksia di jaringan otak sehingga hewan coba siap untuk diteliti lebih lanjut. Prosedur untuk mengimplementasikan metode ini tidak rumit dan semahal metode-metode penginduksian stroke lainnya. Sehingga metode UCAO ini dapat diterapkan dengan mudah, ekonomis, dan bisa dilakukan oleh siapapun untuk membantu perkembangan terapi stroke di Indonesia.

MMP-9 adalah marker awal stroke yang dapat dideteksi menggunakan ELISA melalui serum darah hewan coba. MMP-9 muncul bersamaan dengan infiltrasi neutrofil dalam neuron otak yang mengalami iskemik. Ekspresi MMP-9 juga meningkat seiring dengan proses iskemik yang semakin meningkat pada sel neuron.⁹ Mekanisme transkripsi MMP-9 dalam sel neuron dimulai dari diekspresikannya faktor inflamatori seperti IL-1 β , TNF- α , FGF dan EGF dalam kondisi iskemik¹⁰. Faktor-faktor inflamatori tersebut menstimulasi ekspresi MMP-9 dengan mengaktifkan sinyal *pathway protein kinase* MEK1-Erk, P38, PI3K-Akt. Kemudian, protein kinase tersebut meregulasi

transkripsi dari MMP-9 dengan mengaktivasi AP-1 dan NF- κ B yang akan berikatan dengan elemen cis. Hal ini akan membentuk chromatin remodeling complexes, co-activator, dan memicu transkripsi dari MMP-9.¹¹

Metode UCAO ini diharapkan dapat meningkatkan kadar MMP-9 sampel darah hewan coba sehingga dapat memastikan bahwa metode ini efektif dalam membuat tikus model stroke untuk penelitian.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan rancangan *randomized post test controlled group design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar MMP-9 dari tikus yang diinduksi stroke dengan menggunakan metode UCAO (Unilateral Cerebral Artery Occlusion). Variable bebas dari penelitian ini merupakan metode penginduksian stroke UCAO, dan variabel terganggunanya adalah kadar MMP-9 setelah induksi stroke UCAO.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Maret 2013.

Hewan Coba

Populasi penelitian ini menggunakan tikus wistar (*Rattus norvegicus*) jantan yang berumur 8-10 minggu. Sampel penelitian menggunakan 12 tikus yang diambil secara random sampling dengan kriteria inklusi dan eksklusi, serta kriteria drop out. Kriteria inklusi tikus percobaan antara lain tikus jenis *Rattus norvegicus* Wistar, tikus berjenis kelamin jantan, berumur 8-10 minggu, dengan berat badan rata-rata 150 gram dan tikus berwarna putih sehat, aktif, bertingkah laku normal dan tidak ada kelainan anatomic. Sedangkan kriteria eksklusi yaitu tikus yang selama penelitian tidak mau makan dan tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung.

Tikus dinyatakan drop out apabila sesuai kriteria eksklusi dan diganti tikus lain yang sesuai dengan kriteria inklusi, sehingga didapat jumlah tikus sesuai ketentuan sampel. Kemudian, sampel tikus dibagi menjadi 2 kelompok, kontrol (K) dan perlakuan (P), masing-masing kelompok 6 tikus. Aklimatisasi tikus dilakukan selama 12 hari hingga berat tikus berkisar antara 150-200 gram.

Induksi Stroke

Metode induksi stroke dilakukan dengan metode *Unilateral Carotid Artery Occlusion*, yaitu dengan melakukan ligasi pada arteri karotis interna dan eksterna tikus pada sisi kiri. Prosedurnya antara lain tikus dianestesi menggunakan ketamin dengan dosis 40 mg/kgBB. Kemudian tikus difiksasi dalam posisi supinasi di atas tempat pembedahan. Selanjutnya bulu pada bagian leher dicukur lalu kulit bagian leher dibersihkan menggunakan alkohol 70% dengan kapas dan diberi antiseptik untuk mencegah infeksi saat melakukan insisi. Setelah itu dilakukan insisi dengan menggunakan skalpel pada garis tengah leher secara vertikal sepanjang 2–3 cm. Mencari arteri karotis yang terletak di sebelah lateral trakea. Meligasi arteri karotis selama 45 menit dengan menggunakan benang prolene ukuran 6.0. Setelah 45 menit, ikatan benang prolene dilepas. Lalu luka insisi tersebut ditutup dan dijahit dengan menggunakan benang catgut. Setelah itu luka jahitan diolesi dengan antiseptik, kemudian luka ditutup dengan kasa steril. Tikus lalu disonde dengan dextrose 10%.

Pengukuran Kadar MMP-9

Pengukuran kadar marker MMP-9, melalui darah yang diambil lewat ekor tikus. Serum kemudian dianalisa menggunakan Total MMP-9 Quantikine ELISA kit (R&D systems, United States of America). Pengambilan darah tikus dilakukan sehari setelah penginduksian stroke.

HASIL PENELITIAN

Setelah aklimatisasi dilakukan, darah tikus diambil untuk melihat kadar MMP-9 pada tikus kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Peningkatan kadar marker MMP-9 di dalam darah tikus, mengindikasikan adanya kerusakan jaringan otak yang disebabkan oleh stroke. Jaringan otak yang terkena dampak dari stroke akan mengalami hipoksia dan tidak mendapat suplai oksigen yang dibutuhkan dalam homeostasis.

Jumlah total tikus yang diambil darahnya adalah 8 ekor. Tikus kelompok kontrol berjumlah 4 ekor, dan kelompok perlakuan yang diinduksi stroke berjumlah 4 ekor. Hal ini dikarenakan ada 2 ekor tikus dari kelompok perlakuan yang mati saat induksi stroke, sehingga 2 tikus dari kelompok kontrol ikut dieksklusikan. Hasil rata-rata dan

standard deviasi dari hasil pengukuran MMP-9 darah tikus, dijelaskan di tabel 1.

Tabel 1. Rerata Kadar MMP-9 Darah Tikus Masing-masing Kelompok Perlakuan (dalam ng/ml).

Kelompok	Jumlah Sampel	Mean	Standar Deviasi
K	4	0.582	0.124
P	4	0.747	0.028

Rata-rata kadar MMP-9 darah tikus dari tiap kelompok perlakuan dinyatakan sebagai mean $\pm$ standard deviasi. Dari data yang telah didapatkan, diketahui bahwa pada kelompok K (kelompok kontrol) rata-rata dari kadar MMP-9 darah tikus adalah 0.582 ± 0.124 . Untuk kelompok P (kelompok perlakuan) memiliki rata-rata 0.747 ± 0.028 . Perbandingan rata-rata kadar MMP-9 darah tikus dari tiap kelompok perlakuan dapat dilihat dari gambar 1.

Gambar 1. Perbandingan Rata-rata Kadar MMP-9 Darah Tikus dari Tiap Kelompok Perlakuan.

Pada gambar 1 dapat dilihat rata-rata kadar MMP-9 darah tikus dari kelompok K (kelompok kontrol) adalah 0.582 ± 0.124 . Untuk kelompok P (kelompok perlakuan) memiliki rata-rata 0.747 ± 0.028 . Gambar 5.1 juga menunjukkan peningkatan kadar marker MMP-9 dalam darah tikus kelompok perlakuan. Hasil penghitungan kadar MMP-9 darah tikus yang telah didapat dianalisis dengan tes non-parametrik, Mann-Whitney dan Kruskal-Wallis, menggunakan software SPSS 21.

DISKUSI

Stroke iskemik adalah suatu keadaan patologi, di mana otak mengalami kekurangan pasokan oksigen dan nutrisi.¹² Penelitian ini menggunakan subjek penelitian tikus model stroke, yaitu galur Wistar (*Rattus norvegicus*). Tikus ini diinduksi stroke dengan menggunakan metode Unilateral Carotid Artery Occlusion. Dengan metode ini, pasokan darah ke otak akan terhambat dan

terjadilah stroke akibat penyumbatan atau disebut juga stroke iskemik. Setelah melakukan penginduksian stroke, dilakukan pengecekan kadar marker MMP-9 dari serum darah yang diambil dari ekor tikus. Marker MMP-9 merupakan biomarker petunjuk stroke, dan kadarnya akan meningkat setelah periode stroke iskemik.¹³

Penelitian ini hendak menilai efektivitas metode UCAO (Unilateral Cerebral Artery Occlusion) sebagai metode untuk membuat tikus model stroke iskemik. Marker MMP-9 darah tikus diukur untuk melihat apakah tikus yang diinduksi stroke dengan metode tersebut mengalami hipoksia jaringan otak. Hipoksia pada jaringan otak menyebabkan kerusakan jaringan dan meningkatkan kadar marker MMP-9.⁹ Mekanisme transkripsi MMP-9 dalam sel neuron dimulai dari diekspresikannya faktor inflamatori seperti IL-1 β , TNF- α , FGF dan EGF dalam kondisi iskemik¹⁰. Faktor-faktor inflamatori tersebut menstimulasi ekspresi MMP-9 dengan mengaktifkan sinyal pathway protein kinase MEK1-Erk, P38, PI3K-Akt. Kemudian, protein kinase tersebut meregulasi transkripsi dari MMP-9 dengan mengaktifasi AP-1 dan NF- κ B yang akan berikatan dengan elemen cis. Hal ini akan membentuk chromatin remodeling complexes, co-activator, dan memicu transkripsi dari MMP-9.¹¹

Hasil dari pengukuran kadar marker MMP-9 menunjukkan kelompok kontrol (K) dengan rata-rata $0.582 \text{ ng/ml} \pm 0.124$. Untuk kelompok perlakuan (P), menunjukkan nilai rata-rata $0.747 \text{ ng/ml} \pm 0.028$. Dari hasil yang didapat diperkirakan metode induksi stroke UCAO dapat menyebabkan kerusakan jaringan otak tikus seperti stroke iskemik. Hal ini didasari oleh kadar marker MMP-9 yang tinggi pada pemeriksaan darah tikus kelompok perlakuan (P) dengan rata-rata $0.747 \text{ ng/ml} \pm 0.028$ dibandingkan dengan kadar MMP-9 pada pemeriksaan darah tikus kelompok kontrol (K).

Pada uji normalitas data Shapiro-Wilk, sebaran data kadar marker MMP-9 dari 2 kelompok perlakuan dinyatakan normal ($p > 0.05$). Lalu data diuji menggunakan metode Independent T-test dan ditemukan data tidak homogen, sehingga analisis dilanjutkan dengan metode Mann-Whitney dan Kruskal-Wallis. Uji Mann-Whitney dilakukan untuk melihat hubungan antar kelompok perlakuan. Hasilnya didapatkan perbedaan yang signifikan di antara kelompok kontrol (K) dan

kelompok perlakuan (P) dengan $p = 0.021$ ($p < 0.05$). Uji Kruskal-Wallis dilakukan untuk melihat perbedaan antar kelompok. Dan dari hasil uji dinyatakan signifikan dengan $p = 0.021$ ($p < 0.05$). Saran untuk penelitian ini adalah dilakukannya pengukuran kadar marker MMP-9 sebelum dan sesudah induksi stroke (*pre-post test design*).

SIMPULAN

Metode UCAO (Unilateral Cerebral Artery Occlusion) dapat meningkatkan kadar MMP-9 serum tikus.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cruz-Flores, S., et al. Racial-ethnic disparities in stroke care: the American experience: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. American Stroke Association. Stroke. 2011 42(7) : 2091-116
2. Yayasan Stroke Indonesia. 2011. Jakarta, Republik Indonesia.
3. World Health Organization. 2011. The International Agenda for Stroke Marc Fisher, MD, University of Massachussets. Stroke AHA/ASA. Norrving B. 1st Global Conferences on Healthy Lifestyles and Noncommunicable Diseases Control. Moscow.
4. Zieve, D. 2011. Stroke. Neurosurgery, Cedars-Sinai Medical Center. National Library of Medicine. Los Angeles.
5. Caplan, A. 2007. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. J cell physiol. 213(2): 341-347.
6. Soyuer, F. 2005. Ischemic Stroke: Motor Impairment And Disability With Relation To Age And Lesion Location. The Internet Journal of Neurology. 3(2): DOI: 10.5580/9b4.
7. Mayo Clinic. 2012. Stroke: Treatment and Drug. <http://mayoclinic.com/health/stroke/DS00150/DSECTION=treatments-and-drugs>. Diakses pada tanggal 13 Oktober 2012.
8. Kuraoka, M., Furuta, T., Matsuwaki, T., Omatsu, T., Ishii, Y., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y. Direct Experimental Occlusion of the Distal Middle Cerebral Artery Induces High Reproducibility of Brain Ischemia in Mice. Exp. Anim. 2009. 58(1):19-29.
9. Justicia, C., Panes, J., Sole, S., Cervera, A., Delofeu, R., Chamorro, A., Planas, A.M. Neurotrophil Infiltration Increase Matrix Metalloproteinase-9 in the Ischemic Brain After Occlusion/Reperfusion of the Middle Cerebral Artery in Rats. J Cereb Blood Flow Metab. 2003. 23(12):1430-1440.
10. Ruhul Amin AR, Senga T, Oo ML, Thant AA, Hamaguchi M. Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1 β : a role for the dual signalling pathways, Akt and Erk. Genes Cells. 2003 Jun; 8(6):515-23.
11. Ma Z, Shah RC, Chang MJ, Benveniste EN. Coordination of cell signaling, chromatin remodeling, histone modifications, and regulator recruitment in human matrix metalloproteinase 9 gene transcription. Mol Cell Biol. 2004 Jun; 24(12):5496-509.
12. Sjahrir, H. 2003. Stroke Iskemik, Yandira Agung, Medan, p. 1-3.
13. Reynolds, M.A., Kirchick, H.J., Dahlen, J.R., Anderberg, J.M., Mcpherson, P.H., Nakamura, K.K., Laskowitz, D.T., Valkirs, G.E., Buechler, K.F. Early Biomarkers of Stroke. Clinical Chemistry. 2003. 49(10):1733-1739.