

PENELITIAN

Pengaruh Midazolam Dosis 10 mg/kgbb dan 40 mg/kgbb pada Ekspresi m-RNA Gen BAX di Otak Tikus Wistar

Tony Irawan, Sudadi, Djayanti Sari

Departemen Anestesiologi dan Terapi Intensif, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRAK

Latar Belakang: Neurotransmitter GABA dan NMDA berperan penting pada sel otak yang masih mengalami perkembangan saraf. Secara umum, agen anestesi bekerja pada kedua neurotransmitter tersebut. Midazolam menghambat neurotransmisi dengan cara potensiasi reseptor GABA. Paparan pada reseptor GABA mengganggu perkembangan sel saraf dan memicu terjadinya proses apoptosis yang ditandai dengan peningkatan gen pro apoptosis seperti Bax, Bak dan Bim.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian *experimental control trial*, sampel dibagi menjadi 3 kelompok. 27 tikus dibagi menjadi kontrol NaCl 0,9% (n= 9), midazolam 10 mg/kgbb (n= 9), midazolam 40 mg/kgbb (n= 9) disuntikkan secara intraperitoneal. Kemudian otak tikus di setiap kelompok diambil dengan potong beku. Ekspresi gen proapoptosis mRNA Bax kemudian diukur dengan PCR.

Hasil: Pemberian midazolam dengan dosis 10 mg/kgbb dan midazolam dosis 40 mg/kgbb terjadi peningkatan ekspresi gen-Bax dan bernilai signifikan < 0,05 jika dibandingkan kelompok kontrol.

Kesimpulan : Terdapat peningkatan signifikan ekspresi gen bax pada pemberian midazolam dosis 10 mg/kgbb dan 40 mg/kgbb pada otak tikus wistar yang masih mengalami perkembangan saraf.

Kata kunci: anestesi pediatrik; apoptosis; gen-bax; midazolam

PENDAHULUAN

Obat-obat anestesi berkerja pada reseptor NMDA dan GABA. Obat anestesi yang berkerja di reseptor NMDA seperti ketamin, *nitrous oxide*, dan xenon. Obat anestesi yang berkerja pada reseptor GABA seperti midazolam, propofol, etomidat, tiopental, isofluran, serta sevofluran.¹

Pada otak yang masih mengalami masa perkembangan neuron, proses apoptosis bisa terjadi karena hambatan pada reseptor NMDA atau aktivasi yang berlebih pada reseptor GABA, yang pada hal ini kedua reseptor tersebut berhubungan erat dengan pemberian obat anestesi. Midazolam berkerja pada reseptor GABA tersebut.²

Pada penelitian lainnya menyebutkan, apoptosis juga terjadi pada paparan jangka panjang pada isofluran dan dinitrogen oksida memodulasi BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) dan jalur

persinyalan AKT yang pada akhirnya merangsang terjadinya kematian akibat intrinsik dan ekstrinsik.³

Apoptosis adalah mekanisme kematian sel yang terprogram bisa terjadi secara natural ataupun proses esensial untuk mempertahankan hidup suatu organ. Apoptosis bisa disebabkan oleh hipoksia, obat-obatan, sitokin, dan hormonal. Pada penelitian ini berupaya untuk melihat efek obat anestesi pada proses apoptosis di otak dan penanganan proses tersebut.

Proses apoptosis dimulai dengan mengaktifkan beberapa sinyal apoptosis berantai yang disebut *cascade*. Protein yang berperan di dalam *cascade* tersebut dibagi menjadi 2 kelas utama yaitu keluarga Bcl-2 dan keluarga caspase. Beberapa diantaranya memiliki efek inhibitor maupun stimulator. Yang termasuk pro-apoptosis adalah bax, bim, dan bad yang berhubungan dengan proses oligomerisasi dari

stimulasi dari luar membran mitokondria yang memicu pengeluaran dari sitokrom C.⁴

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan *experimental control trial study*, Penelitian ini dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan UGM dan Departemen Patologi Anatomi UGM. Penelitian ini dilakukan pada April 2019 sampai Juli 2019.

Penelitian dilakukan pada tikus jantan dengan ras wistar jenis kelamin jantan, kondisi sehat usia 21-22 hari, berat badan 40–50 gram. Kriteria eksklusi pada penelitian ini tikus wistar dengan luka atau kecacatan pada area kepala, tikus jantan wistar yang pada saat penelitian terjadi trauma kepala, tikus jantan wistar yang menunjukkan perubahan perilaku pada saat penelitian, tikus jantan wistar yang mati pada saat penelitian berlangsung, serta tikus jantan wistar yang sudah pernah dipakai pada penelitian lainnya. Tikus tersebut dibagi menjadi 3 kelompok:

- Kelompok 1: Tikus pada kelompok ini dilakukan pemberian NaCl 0,9% i.p,
- Kelompok 2: Tikus pada kelompok ini dilakukan pemberian midazolam dengan dosis 10 mg/kgbb i.p,
- Kelompok 3: Tikus pada kelompok ini dilakukan pemberian midazolam dengan dosis 40 mg/kgbb i.p.

Setelah itu tikus tersebut dilakukan krepitasi dan diambil bagian hippocampus dan dibawa ke bagian

Patologi Anatomi untuk dilakukan pemeriksaan dengan RT-PCR. Sebelum pemeriksaan PCR dilakukan ekstraksi sampel dengan menggunakan GeneAll Hybrid-R.

Penelitian ini menggunakan analitik komparatif kategorikal tidak berpasangan, sehingga analisis data yang sesuai adalah menggunakan Anova (one way-Anova) karena distribusi normal.

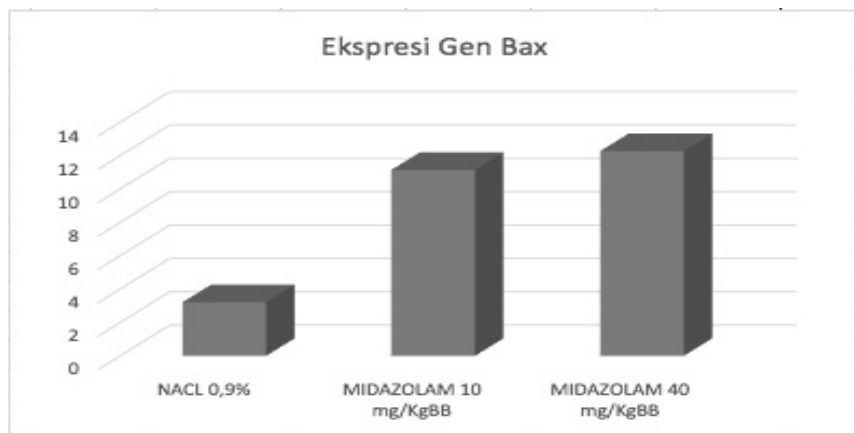
HASIL

Sampel pada penelitian ini sebanyak 27 tikus dengan berat badan antara 40-50 mg dan umur 21-22 hari, dibagi atas 3 kelompok, kelompok 1 terdapat 9 tikus yang diberikan NaCl 0,9%, kelompok 2 diberikan midazolam dosis 10 mg/kgbb, dan kelompok 3 diberikan midazolam dosis 40 mg/kgbb.

Tabel 1. Nilai rata-rata ekspresi m-RNA Gen Bax

GROUP	MEAN	SD	N
NAACL 0,9%	3.22	0.629	9
MIDAZOLAM 10 mg/KgBB	11.15	3.81	9
MIDAZOLAM 40 mg/KgBB	12.28	2.859	9

Pada Tabel 1, menerangkan nilai rata-rata ekspresi kelompok kontrol (NaCl 0,9%) didapatkan nilai rata-rata gen bax 3,22. Pada pemberian midazolam dengan dosis 10 mg/kgbb terjadi peningkatan ekspresi mRNA gen BAX 11,15. Begitu juga pada pemberian midazolam pada dosis 40 mg/kgbb terjadi peningkatan ekspresi mRNA gen BAX 12,28 dari kontrol.



Gambar 1. Perbandingan Ekspresi mRNA Gen BAX pada jaringan otak

Pada Gambar 1 menerangkan terlihat peningkatan pada ekspresi mRNA gen BAX pada

tikus wistar yang diberikan midazolam dengan dosis 10 mg/kgbb dan dosis 40 mg/kgbb.

Tabel 2. Perbandingan ekspresi mRNA gen Bax

Kelompok	Kelompok	P-value	95% Confidence Interval	
			Batas Bawah	Batas Atas
NaCl 0,9%	Midazolam 10 mg/kgbb	0,000	11,79	5,25
	Midazolam 40 mg/kgbb	0,000	12,39	5,86
Midazolam 10 mg/kgbb	NaCl 0,9%	0,000	5,25	11,79
	Midazolam 40 mg/kgbb	0,889	3,87	2,66

Tabel 2 merupakan perbandingan tiap grup penelitian. Dari tabel tersebut menerangkan bahwa pemberian midazolam dengan dosis 10 mg/kgbb dan midazolam dosis 40 mg/kgbb terjadi peningkatan gen-Bax dan bernilai signifikan $< 0,05$ jika dibandingkan kelompok kontrol. Dan pada perbandingan pemberian midazolam dengan dosis 10 mg/kgbb dan 40 mg/kgbb tidak signifikan $> 0,05$

DISKUSI

Pada otak yang masih mengalami masa perkembangan saraf membutuhkan keseimbangan neurotransmitter dalam proses perkembangannya. Midazolam bekerja pada reseptor GABA yang merupakan inhibisi utama dalam otak. Penelitian neurotoksisitas pada populasi pediatrik banyak membahas tentang kejadian apoptosis pasca paparan obat-obat anestesi.^{5,6,7}

Pada otak yang mengalami pembentukan saraf mengalami 2 mekanisme yaitu *exuberant synaptogenesis* dan *pruning synaptogenesis*. Saat *pruning* ini memiliki peran dalam pembentukan proses kecerdasan dan meregulasi energi di otak tersebut. Pemberian obat-obatan pada hal ini pemberian midazolam pada saat perkembangan saraf pada otak memicu terjadinya apoptosis sehingga akan berpengaruh pada kecerdasan anak tersebut.

Secara umum, agen-agen anestesi menghambat neurotransmisi dengan cara potensiasi GABA dan menghambat NMDA. Saat masa perkembangan, aktivitas penghambatan neuronal yang artifisial

diperkirakan dapat menginduksi *cascade* melalui gangguan terhadap kinerja faktor-faktor pertumbuhan *Brain Derived Neurotrophic Factor*, yang kemudian dapat mengaktifkan *cascade* apoptosis.³ BDNF adalah protein di otak dan saraf perifer yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan serta kelangsungan hidup otak.

Paparan midazolam akan menyebabkan terjadinya potensiasi pada GABA sehingga mengganggu perkembangan dari saraf tersebut dan mengaktifkan terjadinya proses apoptosis. Paparan tersebut akan menstimulasi keluarnya sitokrom c dan Aaf (*apoptosis activating factors*). Saat keduanya dilepaskan ke sitoplasma merupakan indikasi bahwa sel tersebut tidak sehat dan menginisiasi program apoptosis. Pelepasan protein mitokondria ini dikontrol secara seimbang melalui anggota keluarga protein Bcl antara pro dan antiapoptosis. Yang termasuk kelompok pro apoptosis seperti Bax, Bak, Bid. Peningkatan jumlah gen Bax menyatakan terjadinya proses apoptosis pada sel tersebut. Pada penelitian ini menggunakan gen Bax yang merupakan protein pro apoptosis sehingga bisa menilai terjadinya apoptosis pada sel otak. Ada biomarker lainnya yang bisa dilakukan untuk menilai terjadinya proses apoptosis di tingkat m-RNA bahkan di tingkat protein ataupun anti apoptosis yang bisa dilakukan untuk penelitian selanjutnya.

Pemberian midazolam dengan dosis 10 mg/kgbb dan 40 mg/kgbb jika dikonversikan menggunakan tabel Laurence and Bacharach, dosis yang didapat sekitar 12-16 kali yang sebanding dengan dosis

sedasi dan induksi pada manusia karena dosis midazolam sedasi pada pediatrik 0,05-0,1 mg/kgbb IV dan 0,1-0,3 mg/kgbb IM dan dosis induksi 0,1-0,5 mg/kgbb IV. Pernyataan tersebut diperkuat oleh Yuong dkk., 2005 menyatakan dosis midazolam pada tikus untuk sedasi ataupun induksi 8-16 kali dari dosis manusia.^{7,8,9}

Pada penelitian ini terjadi peningkatan signifikan ekspresi mRNA gen Bax di otak pada kelompok tikus dengan pemberian midazolam dosis 10 mg/kgbb dan midazolam dosis 40 mg/kgbb jika dibandingkan dengan kontrol NaCl 0,9%. Tetapi jika kita bandingkan pemberian dosis midazolam 10 mg/kgbb dengan 40 mg/kgbb pada tikus yang masih mengalami perkembangan saraf, ekspresi bax di otak tidak signifikan. Hal tersebut disebabkan karena pada otak yang masih mengalami perkembangan saraf paparan midazolam sudah menyebabkan gangguan aktifitas dari reseptor GABA.

Keterbatasan penelitian ini adalah hanya menilai apoptosis suatu sel dari tingkat m-RNA pro apoptosis, sebaiknya melakukan penelitian tentang efek pro apoptosis atau anti apoptosis oleh obat anestesi dengan menggunakan primer lainnya dan mendapatkan hasil optimal, dilakukan penelitian multilevel ditingkat mRNA dan pada tingkatan protein eksekusi apoptosis. Untuk meminimalkan faktor perancu dari hasil penelitian, diharapkan pada penelitian selanjutnya dilakukan pada hewan dengan struktur otaknya lebih mendekati manusia seperti kera ekor panjang dan melakukan pemeriksaan tekanan darah dan analisis gas darah untuk mencegah terjadinya hipotensi dan hipoksia selama tikus disedasi.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi gen-Bax pada pemberian midazolam dosis 10 mg/kgbb dan dosis 40 mg/kgbbb pada otak tikus wistar yang masih mengalami perkembangan saraf

DAFTAR PUSTAKA

1. Yuki, K. Mio, Y. Uezono, S. Anesthesia and Neurotoxicity: Implication for Pediatric.. Springer : Japan. 2017: Chapter 33-46.
2. Zuccherelli, L. Long term effects of anaesthesia: neurotoxicity at the extremes of age. FANZCA: Southern African. 2010: 70-74.
3. Lu, L.X., Yon, J.-H., Carter, L.B., Jevtovic-Todorovic, V. General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis* 11. 2006. 1603-1615.
4. So, E.C., Huang, B.M., Chen, Y.C., Wang, S.C., Wu, C.C., Huang, M.C., Lai, M.S., Pan, B.S., Kang, F.C. Midazolam regulated caspase pathway, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and cell cycle induce apoptosis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Dovepress. 2016 : 2519-2533.
5. Creeley, C.E., Olney, J.W. The Young: Neuroapoptosis Induced by Anesthetics and What to Do About It, New York, 2010 : 442-448.
6. Jevtovic-Todorovic, V., Hartman, RE., Izumi, Y., Benshooff, ND., Diktrianian, K., Zorumski, CF., Olney, JW., Wozniak, DF. Early Exposure to Common Anesthetic Agent Causes Widespread Neurodegeneration in the Developing Rat Brain and Persistent Learning Deficits. Departemen of Neurology and Psychiatry Washington University. 2003.
7. Yuong, C., Todorovic, VJ., Qin, YQ., Tenkova, T., Wang, H., Labruyere, J., Olney, JW. Potential of Ketamin and Midazolam, Individual or in Combination, to Induce Apoptotic Neurodegeneration in the Infant Mouse Brain. *British Journal of Pharmacology*: Washington, 2005.
8. Luo, J., Guo, J., Han, D., Li, H. Comparison of Dexmedetomidine and Midazolam on Neurotoxicity in Neonatal Mice. *PubMed*. 2013: 607-610
9. Laurence and Bacharach, A.L. Evaluation Drugs Activity. Academic Press. 1964