

**TESIS**

**EFEK RENDAMAN AIR CO<sub>2</sub> KADAR TINGGI PADA TIKUS GALUR WISTAR  
(*Rattus Norvegicus*) JANTAN NORMAL DAN YANG DIBUAT *ACUTE LIMB  
ISCHAEMIC* TERHADAP PERUBAHAN PARAMETER KERUSAKAN OTOT DAN  
GAMBARAN HISTOPATOLOGI**

Disusun dan diajukan oleh

**ADELAIDE ADIWANA  
C116 216 105**



**PROGRAM STUDI ILMU PENYAKIT JANTUNG DAN  
PEMBULUH DARAH  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021**

EFEK RENDAMAN AIR CO<sub>2</sub> KADAR TINGGI PADA TIKUS GALUR WISTAR (*Rattus  
Norvegicus*) JANTAN NORMAL DAN YANG DIBUAT *ACUTE LIMB ISCHAEMIC*  
TERHADAP PERUBAHAN PARAMETER KERUSAKAN OTOT DAN  
HISTOPATOLOGI

TESIS

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar spesialis  
Program Studi Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah  
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin

Disusun dan diajukan oleh:

**ADELAIDE ADIWANA**

**C116 216 105**

**PROGRAM STUDI ILMU PENYAKIT JANTUNG DAN  
PEMBULUH DARAH  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2021**

TESIS

**EFEK RENDAMAN AIR CO<sub>2</sub> KADAR TINGGI PADA TIKUS GALUR  
WISTAR (*Rattus Norvegicus*) JANTAN NORMAL DAN YANG DIBUAT *ACUTE*  
*LIMB ISCHAEMIC* TERHADAP PERUBAHAN PARAMETER KERUSAKAN  
OTOT DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI**

Disusun dan diajukan oleh :

**ADELAIDE ADIWANA**

**C116 216 105**

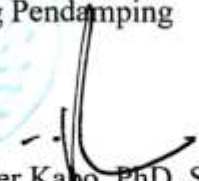
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Magister Program Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal 9 Juni 2021  
pada tanggal 9 Juni 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

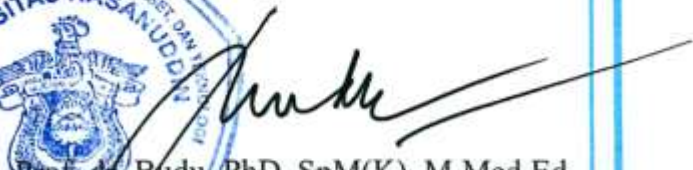
  
Dr. dr. Muzakkir Amir, SpJP(K)  
NIP. 19710810 200012 1 003

  
Prof. dr. Peter Kabo, PhD, SpFK, SpJP  
NIP. 19500329 197612 1 001

Ketua Program Studi,

Dekan Fakultas Kedokteran,

  
Dr. dr. Idar Mappangara, SpPD, SpJP (K)  
NIP. 19660721 199603 1 004

  
Prof. dr. Budu, PhD, SpM(K), M.Med.Ed  
NIP. 19661231 199503 1 009



**KARYA AKHIR**

**EFEK RENDAMAN AIR CO<sub>2</sub> KADAR TINGGI PADA TIKUS GALUR  
WISTAR (*Rattus Norvegicus*) JANTAN NORMAL DAN YANG DIBUAT *ACUTE*  
*LIMB ISCHAEMIC* TERHADAP PERUBAHAN PARAMETER KERUSAKAN  
OTOT DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI**

Disusun dan diajukan oleh :

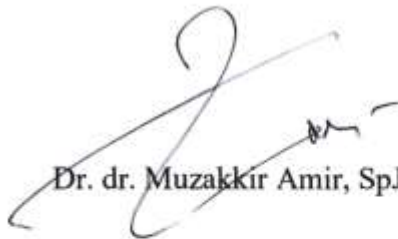
**ADELAIDE ADIWANA**

Nomor Pokok : C116 216 105

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis  
Pada tanggal 9 Juni 2021  
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

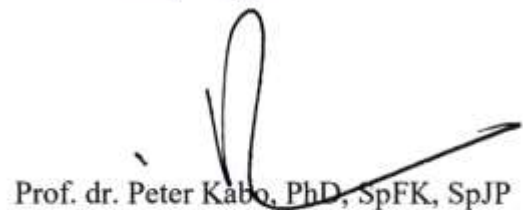
Menyetujui  
Komisi Penasihat,

Pembimbing Utama



Dr. dr. Muzakkir Amir, SpJP(K)

Pembimbing Anggota



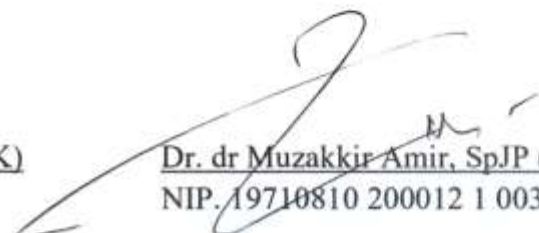
Prof. dr. Peter Kabo, PhD, SpFK, SpJP

Ketua Program Studi Jantung  
dan Pembuluh Darah,  
Universitas Hasanuddin



Dr. dr. Idar Mappangara, SpPD, SpJP (K)  
NIP. 19660721 199603 1 004

Ketua Departemen Kardiologi dan  
Kedokteran Vaskular,  
Universitas Hasanuddin



Dr. dr Muzakkir Amir, SpJP (K)  
NIP. 19710810 200012 1 003

## PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Adelaide Adiwana  
NIM : C116 216 105  
Program Studi : Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah  
Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa tesis dengan judul EFEK RENDAMAN AIR CO<sub>2</sub> KADAR TINGGI PADA TIKUS GALUR WISTAR (*RATTUS NORVEGICUS*) JANTAN NORMAL DAN YANG DIBUAT *ACUTE LIMB ISCHAEMIC* TERHADAP PERUBAHAN PARAMETER KERUSAKAN OTOT DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila di kemudian hari tesis karya saya ini terbukti bahwa sebagian atau keseluruhannya adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 9 Juni 2021

Yang menyatakan,



Adelaide Adiwana

## **PENETAPAN PANITIA PENGUJI**

Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji pada

Tanggal 9 Juni 2021

Panitia penguji Tesis berdasarkan SK Dekan Fakultas Kedokteran

Universitas Hasanuddin

No.322/UN4.6.1/KEP/2021

Ketua : Dr. dr. Muzakkir Amir, SpJP (K)

Anggota : 1. Prof. dr. Peter Kabo, Ph.D, Sp.FK, Sp.JP (K)  
2. Dr. dr. Irfan Idris, MKes  
3. dr. M. Husni Cangara, PhD, SpPA, DFM  
4. Dr. dr. Andi Alfian Zainuddin, MKM  
5. Dr. dr. Idar Mappangara, SpPD, SpJP (K)

## KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia yang telah dilimpahkan-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis ini, yang merupakan karya akhir untuk melengkapi persyaratan penyelesaian Program Pendidikan Dokter Spesialis pada Program Studi Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar.

Pada kesempatan ini, saya ingin menghaturkan penghargaan dan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. **Prof. Dr. Dwia A. Tina Pulubuhu, MA**, Rektor Universitas Hasanuddin, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Dokter Spesialis di Universitas Hasanuddin Makassar.
2. **Prof. dr. Budu, PhD, SpM (K), M.MED.ED**, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis di bidang Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah.
3. **dr. Uleng Bahrun, SpPK (K), PhD** Koordinator PPDS-I Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin bersama staf, yang senantiasa memantau kelancaran Program Pendidikan Dokter Spesialis Bidang Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah.
4. **Dr. dr. Muzakkir Amir, SpJP (K)** dan **Prof. dr. Peter Kabo, PhD, SpFK, SpJP (K)** sebagai Kepala dan mantan Kepala Departemen Kardiologi dan Kedokteran Vaskular Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar serta selaku pembimbing karya akhir saya, atas kesediaannya membimbing sejak perencanaan hingga selesainya karya akhir ini, senantiasa memberikan perhatian dalam membaca, mengoreksi, berdiskusi, dan memberikan saran dalam perbaikan dan penyempurnaan karya akhir ini, serta atas kesediaan beliau untuk menerima, mendidik, membimbing,

dan memberi nasihat yang sangat berharga kepada saya dalam mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah.

5. **Dr. dr. Idar Mappangara, SpPD, SpJP (K)** sebagai Ketua Program Studi bagian Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar yang senantiasa memberikan motivasi, membimbing dan mengawasi kelancaran proses pendidikan selama saya mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah.
6. **Dr. dr. Abdul Hakim Alkatiri, SpJP (K)** selaku Sekretaris Program Studi Departemen Kardiologi dan Kedokteran Vaskular, Universitas Hasanuddin atas bimbingan, nasihat, dan dukungannya selama saya menempuh Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah.
7. **dr. Zaenab Djafar, SpPD, SpJP (K)** selaku pembimbing akademik yang senantiasa memberikan motivasi, membimbing, dan mengawasi kelancaran proses pendidikan selama saya mengikuti Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah di Universitas Hasanuddin, Makassar.
8. **Dr. dr. Irfan Idris, MKes** selaku pembimbing karya akhir saya atas kesediaannya membimbing, memberi masukan, berdiskusi, serta memfasilitasi penggunaan alat JESC CREA BC2000 yang menjadi tulang punggung penelitian ini.
9. **dr. M. Husni Cangara, PhD, SpPA, DFM** selaku pembimbing karya akhir saya, khususnya di bidang Patologi Anatomi, atas kesediaannya membimbing, senantiasa memberikan perhatian dalam berdiskusi, memberi saran dan masukan mulai dari tahap perencanaan hingga penyempurnaan karya akhir ini.
10. **Dr. dr. Andi Alfian Zainuddin, MKM** selaku konsultan statistik atas kesediaannya membimbing dan memberi masukan sejak awal hingga akhir penelitian ini.



11. Para Penguji, seluruh Guru Besar, Konsultan, dan Staf Pengajar Departemen Kardiologi dan Kedokteran Vaskular Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar: **Prof Junus Alkatiri, SpPD-KKV, SpJP (K), Prof. Dr. dr. Ali Aspar Mappahya, SpPD, SpJP (K), Dr. dr. Idar Mappangara, SpPD, SpJP (K), Dr. dr. Abdul Hakim Alkatiri, SpJP (K), Dr. dr. Khalid Saleh, SpPD-KKV, dr. Nuralim Mallapasi, SpB, SpBTKV, dr. Pendrik Tandean, SpPD-KKV, dr. Zaenab Djafar, SpPD, SpJP (K), dr. Yulius Patimang, SpA, SpJP (K), dr. Almudai, SpPD, SpJP (K), dr. Akhtar Fajar Muzakkir, SpJP (K), dr. Andi Alief Utama Armyn, SpJP (K), dr. Aussie Fitria Ghaznawie, SpJP (K), dr. Az Hafid Nasar, SpJP (K)** sebagai pengajar yang sangat berjasa dan bagaikan orang tua dan kakak yang sangat saya hormati dan banggakan. Tanpa bimbingan mereka, mustahil bagi saya bisa mendapatkan ilmu dan menimba pengalaman yang sangat berharga selama menempuh pendidikan di Departemen Kardiologi dan Kedokteran Vaskular.
12. **Dr. Noor Yasni** dan **Irwandi** yang telah banyak membantu dan memberikan masukan-masukan yang sangat berguna sehingga penyusunan tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.
13. **Ibu Cia, Adik Ari, Adik Jauari** di Laboratorium Biofarmasi, dan **Pak Bahar** di Laboratorium Entomologi, Universitas Hasanuddin, Makassar yang telah sangat membantu dan bekerja sama dengan baik selama proses penelitian ini sehingga dapat terlaksana dengan baik.
14. Para pegawai Departemen Kardiologi dan Kedokteran Vaskular FK-UNHAS: **Ibu Ida, Kak Hikmah, Kak Bara, Kak Rahmat, Kak Enal**, paramedis, *cleaning service*, *security*, dan pekerja pada masing-masing rumah sakit, atas segala bantuan dan kerja samanya selama ini.

15. Teman-teman angkatan **Lambe Turah Januari 2017: dr. Maya Shofia, dr. Abdul Gofur, dr. Nirsyad Saphiro, dr. Edy Kurniawan, dr. Paskalis Indra Suryajaya, dr. Muchtar Nora Ismail Siregar, dr. Nurhidayah** atas jalinan persaudaraan, bantuan, serta dukungan kalian memberikan semangat dalam menempuh pendidikan di Departemen Kardiologi dan Kedokteran Vaskular, Universitas Hasanuddin, Makassar.
16. Seluruh teman sejawat peserta PPDS-1 Ilmu Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar atas bantuan, jalinan persaudaraan dan kerjasamanya selama ini.

Pada saat yang berbahagia ini, tidak lupa saya sampaikan rasa hormat, terima kasih, dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada suami saya **dr. Willy Anthony, SpPD, ketiga anak saya: Aurelia Anthony, Aaron Winston Anthony, dan Austin Wilson Anthony, orang tua saya: Samad Adiwana (Alm) dan Yoke Dewi Puspitasari, mertua saya: Frans Hadi dan Monica, saudara ipar saya: dr. Yasinta Helen dan dr. Lyndon Darwin, asisten keluarga saya: Pak Purwito, Mbak Cucu, Mbak Rima, dan Mbak Sri; serta seluruh keluarga besar saya** yang sangat saya cintai dan hormati, yang dengan tulus dan penuh kasih sayang senantiasa memberikan dukungan, bantuan, dan mendoakan saya selama saya mengikuti pendidikan ini agar kelak dapat menjadi manusia yang berguna bagi sesama.

Akhir kata, semoga tesis ini dapat bermanfaat. Kiranya Tuhan Yang Maha Esa senantiasa melimpahkan rahmat dan berkat-Nya kepada kita semua. Amin.

Makassar, 9 Juni 2021

Adelaide Adiwana

## ABSTRAK

**Adelaide Adiwana:** Efek Rendaman Air CO<sub>2</sub> Kadar Tinggi pada Tikus Galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) Jantan Normal dan yang Dibuat *Acute Limb Ischaemic* Terhadap Perubahan Parameter Kerusakan Otot dan Histopatologi (**dibimbing oleh Muzakkir Amir, Peter Kabo, Irfan Idrus, Husni Cangara, Andi Alfian**)

**Pendahuluan:** CO<sub>2</sub> telah digunakan sebagai balneoterapi bagi penderita penyakit vaskular perifer sejak abad pertengahan. Banyak studi klinis telah menunjukkan keefektifan terapi CO<sub>2</sub> terhadap mikrosirkulasi sehingga dapat digunakan untuk membantu penyembuhan gangguan sirkulasi perifer. Hingga tulisan ini selesai disusun, belum ada penelitian mengenai efek terapi CO<sub>2</sub> pada kondisi *Acute Limb Ischaemic* (ALI) yang memiliki *prognosis ad malam* meskipun telah mendapatkan terapi standar, sehingga perlu dikembangkan strategi baru untuk memperbaiki prognosis ALI.

**Metode:** Penelitian ini merupakan eksperimental dengan menggunakan 20 ekor tikus Wistar jantan. Setelah diaklimatisasi selama 7 hari, 10 ekor direndam dalam air biasa bersuhu 38°C, 10 ekor lainnya direndam dalam air CO<sub>2</sub> kadar tinggi yang dihasilkan JESC CREA BC-2000 bersuhu 38°C, pH 3.4-4.5, setiap hari selama 10 menit selama seminggu. Kemudian tikus dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok tidak ligasi-rendam air biasa, tidak ligasi-rendam air CO<sub>2</sub>, ligasi-rendam air biasa, dan ligasi-rendam air CO<sub>2</sub>, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Setelah 7 hari direndam, kelompok tidak ligasi diperiksa kadar SGOT dan LDH, sedangkan kelompok ligasi dilakukan ligasi arteri femoralis tungkai kanan belakang dengan metode HLI, dan 48 jam paska-ligasi diperiksa kadar SGOT dan LDH. Perendaman dilanjutkan kembali selama 7 hari. Pada hari ke-14, seluruh kelompok tikus diambil kembali darahnya untuk dicek kadar SGOT dan LDH, kemudian tungkai kanan belakang dipotong setinggi lutut dan direndam dalam formalin 10% untuk kemudian diperiksa histopatologi dengan menggunakan imunohistokimia antibodi CD31 untuk menghitung jumlah vaskular dan pewarnaan HE untuk menilai derajat kerusakan otot skelet. Analisis statistik menggunakan *paired t test / Mann Whitney test*.

**Hasil:** Didapatkan penurunan kadar SGOT dan LDH, peningkatan jumlah vaskular, serta kondisi jaringan otot skelet yang lebih baik pada kelompok tikus yang direndam air CO<sub>2</sub>, baik diligasi maupun tidak ligasi, meskipun perbedaan pada kelompok tidak diligasi dan kadar LDH pada kelompok tikus ligasi tidak berbeda bermakna.

**Kesimpulan:** Rendaman air CO<sub>2</sub> kadar tinggi berefek pada kondisi normal (preventif) maupun ALI (kuratif) pada tikus Wistar jantan.

**Kata Kunci:** rendaman air CO<sub>2</sub> kadar tinggi, ALI, SGOT, LDH, neovaskularisasi, skor kerusakan otot skelet, HLI, CREA, antibodi CD31, *hematoxylin eosin*

## ABSTRACT

**Adelaide Adiwana:** The Effect Of CO<sub>2</sub> Enriched Water Immersion on Normal and Acute Limb Ischaemic Male Wistar Rats (*Rattus Norvegicus*) in Muscle Damage Parameters Changes and Histopathology (supervised by Muzakkir Amir, Peter Kabo, Irfan Idrus, Husni Cangara, Andi Alfian)

**Background:** CO<sub>2</sub> has been used as balneotherapy for patients with peripheral vascular disease since the Middle Ages. Many clinical studies have shown the effectiveness of CO<sub>2</sub> therapy on microcirculation, so that it can be used to treat peripheral circulation disorders. Until now, there has been no research on the effect of CO<sub>2</sub> therapy in Acute Limb Ischemic (ALI) conditions, which have an *ad malam* prognosis despite receiving standard therapy, so it is necessary to develop a new strategy to improve the prognosis of ALI.

**Methods:** This experimental study using 20 male Wistar rats. After acclimatization for 7 days, 10 rats were immersed in normal water at 38°C, the other 10 were immersed in high levels of CO<sub>2</sub> water produced by JESC CREA BC-2000 at 38°C, pH 3.4-4.5, every day for 10 minutes in a week. Then the rats were divided into 4 groups, each group consisting of 5 rats: the non-ligation-immersed in plain water, the non-ligation-immersed in CO<sub>2</sub> water, the ligation-immersed in plain water, and the ligation-immersed in CO<sub>2</sub> water. After 7 days of immersion, the non-ligated group was checked for SGOT and LDH levels, while the ligated group, the femoral artery was ligated using the HLI method at the right hind limb, and 48 hours later, the levels of SGOT and LDH were checked. Immersion was continued again for the next 7 days. On the day 14<sup>th</sup>, all groups were checked the SGOT and LDH levels, then the right hind limb was cut at the knee and immersed in 10% formalin for histopathology examination using CD31 antibody immunohistochemistry for vascular count and HE staining to assess the degree of skeletal muscle damage. Statistical analysis using paired t test / Mann Whitney test.

**Results:** There was a decrease in SGOT and LDH levels, an increase in vascular numbers, and better skeletal muscle tissue conditions in the group of rats that was immersed in CO<sub>2</sub> water, both ligated and non-ligated groups, although the differences in the non-ligated group and LDH levels in the ligated group were not significantly different.

**Conclusion:** CO<sub>2</sub> enriched water immersion had an effect on normal (preventive) and ALI (curative) conditions in male Wistar rats.

**Keywords:** CO<sub>2</sub> enriched water immersion, ALI, SGOT, LDH, neovascularization, skeletal muscle damage score, HLI, CREA, CD31 antibody, hematoxylin eosin

## DAFTAR SINGKATAN

6P	: <i>Pain, Pallor, Pulselessness, Paresthesia, Paralysis, Poikilothermia</i>
AF	: <i>Arteri Femoralis</i>
ALI	: <i>Acute Limb Ischaemia</i>
ANG	: <i>Angiopoetins</i>
AS	: <i>Arteri Saphena</i>
ASO	: <i>Arteriosclerosis Obliterans</i>
AST	: <i>Aspartate Aminotransferase</i>
Ca <sup>2+</sup>	: <i>Ion Kalsium</i>
CCR-2	: <i>CC-chemokine receptor-2</i>
CD31	: <i>Cluster of Differentiation 31</i>
CK	: <i>Creatine Kinase</i>
CLTI	: <i>Chronic Limb-Threatening Ischaemia</i>
CO <sub>2</sub>	: <i>Karbon dioksida</i>
CTA	: <i>Computed Thromography Angiography</i>
DAB	: <i>Diaminobenzidine</i>
DF	: <i>Degrees of freedom</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DSA	: <i>Digital Subtraction Ultrasound</i>
DUS	: <i>Duplex Ultrasound</i>
EC	: <i>endothelial cell</i>
EPC	: <i>Endothelial Progenitor Cells</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
G-CSF	: <i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>

H <sup>+</sup>	: Ion Hidrogen
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	: Asam Karbonat
Hb	: Hemoglobin
HCl	: <i>Hydro Chloride</i>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	: Bikarbonat
HE	: <i>Hematoxylin dan Eosin</i>
HIF	: <i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Viruses</i>
HLI	: <i>Hind Limb Ischaemic</i>
IHC	: <i>Immunohistochemistry</i>
IMA	: Infark Miokard Akut
IP	: Intra-Peritoneal
IQR	: <i>Interquartil Range</i>
IU/l	: <i>International Unit/Litre</i>
KEPK	: Komisi Etik Penelitian Kesehatan
LDH	: <i>Lactat Dehidrogenase</i>
LRP-1	: <i>Low-density lipoprotein Receptor-related Protein-1</i>
Min	: <i>Minimal</i>
Max	: <i>Maximal</i>
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	: <i>Natrium-Kalium Adenosine Triphosfat-ase</i>
NO	: <i>Nitrit Oxide</i>
O <sub>2</sub>	: Oksigen
°C	: Derajat Celcius
PA	: Patologi Anatomi
PAD	: <i>Peripheral Artery Disease</i>

PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCO <sub>2</sub>	: Tekanan Karbon Dioksida
PO <sub>2</sub>	: Tekanan Oksigen
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PGI <sub>2</sub>	: <i>prostacyclin</i>
pH	: Keasaman
PLA <sub>2</sub>	: <i>Phospholipase 2</i>
ppm	: <i>Part per million</i>
RBC	: <i>Red Blood Cell</i>
SD	: Standar Deviasi
SDF-1	: <i>Stromal-Derived Factor-1</i>
SGOT	: <i>Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase</i>
SPSS	: <i>Statistical Package For Social Science</i>
Tx	: <i>Transcriptional</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VF	: Vena Femoralis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN SYARAT GELAR</b> .....	ii
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR</b> .....	v
<b>PENETAPAN PANITIA PENGUJI</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>ABSTRAK</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xiii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xvi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xx
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xxiii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Hipotesis Kerja.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
<b>A. KARBON DIOKSIDA (CO<sub>2</sub>)</b> .....	6
2.1 Sifat Kimia dan Fisika dari CO <sub>2</sub> .....	6
2.2 Transpor CO <sub>2</sub> dalam Darah.....	7
2.2.1 Senyawa Karbamino.....	7



2.2.2 Ion Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ).....	8
2.2.3 Senyawa Terlarut dalam Plasma.....	9
2.3 Efek Fisiologis $\text{CO}_2$ pada Pembuluh Darah Perifer.....	9
2.4 Peran $\text{CO}_2$ pada Penyakit Pembuluh Darah Perifer.....	11
2.5 Difusi $\text{CO}_2$ Melalui Kulit.....	12
2.6 Penggunaan $\text{CO}_2$ dalam Praktik Klinis.....	13
2.7 Rendaman Air $\text{CO}_2$ Kadar Tinggi (Imersi).....	13
2.7.1 Pengaruh Konsentrasi $\text{CO}_2$ .....	15
2.7.2 Pengaruh Suhu.....	17
2.7.3 Pengaruh Waktu (Durasi dan Frekuensi).....	17
2.8 Indikasi dan Kontra Indikasi Terapi $\text{CO}_2$ .....	19
<b>B. ACUTE LIMB ISCHAEMIC (ALI)</b> .....	19
2.9 Pengertian ALI.....	19
2.10 Etiologi ALI.....	20
2.11 Patofisiologi ALI.....	22
2.12 Presentasi Klinis ALI.....	22
2.13 Klasifikasi ALI dan Manfaatnya dalam Menentukan Terapi Serta Prognosis.....	24
<b>C. NEOVASKULARISASI</b> .....	26
2.14. Mekanisme Pembentukan Pembuluh Darah Baru/Neovaskularisasi.....	26
<b>D. HEWAN COBA</b> .....	30
2.15 Tikus Wistar ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	30
2.16 Anatomi Pembuluh Darah Tungkai Tikus Wistar.....	32
2.17 Metode <i>Hind Limb Ischaemia</i> (HLI).....	32
2.18 Parameter Penilaian Derajat Iskemik yang Diinduksi Metode HLI.....	33
2.18.1 <i>Functional Scoring</i> .....	33

2.18.2 Parameter Kerusakan Otot (SGOT dan LDH).....	34
2.18.3 Pemeriksaan Histopatologi.....	35
<b>BAB III. KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP.....</b>	<b>36</b>
3.1 Kerangka Teori.....	36
3.2 Kerangka Konsep.....	36
<b>BAB IV. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>37</b>
4.1 Desain Penelitian.....	37
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	37
4.3 Populasi Penelitian.....	37
4.4 Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel.....	37
4.5 Kriteria Inklusi dan Kriteria Eksklusi.....	38
4.5.1 Kriteria Inklusi.....	38
4.5.2 Kriteria Eksklusi.....	38
4.6 Izin Penelitian dan Kelayakan Etik.....	39
4.7 Alur Penelitian.....	39
4.8 Material Penelitian.....	39
4.8.1 Alat.....	39
4.8.2 Bahan.....	40
4.8.3 Hewan Coba.....	40
4.9 Prosedur Penelitian.....	40
4.9.1 Penyiapan Hewan dan Pemberian Perlakuan Pra-Penelitian.....	40
4.9.2 Cara Membuat Rendaman Air CO <sub>2</sub> Kadar Tinggi .....	41
4.9.3 Cara Ligasi Arteri Femoralis Tikus.....	42
4.9.4 Cara Perlakuan.....	44
4.9.5 Pengukuran Kadar SGOT dan LDH.....	47

4.9.6 Pemeriksaan Histopatologi/PA.....	47
4.10. Definisi Operasional dan Kriteria Objektif.....	48
4.11. Pengolahan Data dan Analisis Data.....	52
<b>BAB V. HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>53</b>
<b>A. KELOMPOK TIKUS TIDAK LIGASI (NORMAL).....</b>	<b>53</b>
5.1 Pengaruh CO <sub>2</sub> Terhadap Kadar SGOT.....	53
5.2 Pengaruh CO <sub>2</sub> Terhadap Kadar LDH.....	54
5.3 Pengaruh CO <sub>2</sub> Terhadap Jumlah Vaskular.....	55
5.4 Pengaruh CO <sub>2</sub> Terhadap Skor Kerusakan Otot Skelet.....	56
<b>B. KELOMPOK TIKUS LIGASI (ALI).....</b>	<b>57</b>
5.5 Pengaruh CO <sub>2</sub> Terhadap Kadar SGOT.....	57
5.6 Pengaruh CO <sub>2</sub> Terhadap Kadar LDH.....	58
5.7 Pengaruh CO <sub>2</sub> Terhadap Jumlah Vaskular.....	59
5.8 Pengaruh CO <sub>2</sub> Terhadap Skor Kerusakan Otot Skelet.....	60
<b>BAB VI. PEMBAHASAN.....</b>	<b>62</b>
<b>Limitasi.....</b>	<b>67</b>
<b>BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>68</b>
7.1 Kesimpulan.....	68
7.2 Saran.....	68
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>69</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>77</b>
Lampiran 1. Persetujuan Etik.....	77
Lampiran 2. Pemeriksaan Histopatologi/PA.....	78
Lampiran 3. Dokumentasi.....	81

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Reaksi pembentukan bikarbonat dalam tubuh.....	6
Gambar 2. Transpor CO <sub>2</sub> dalam darah.....	8
Gambar 3. Transpor aktif CO <sub>2</sub> dalam menjaga pH darah.....	9
Gambar 4. Difusi CO <sub>2</sub> melalui kulit hingga mencapai mikrosirkulasi.....	12
Gambar 5. Efek perendaman CO <sub>2</sub> : (A) membentuk “sikat gas”, (B) kulit memerah pada bagian yang direndam.....	15
Gambar 6. CREA BC-2000.....	16
Gambar 7. Penggabungan air dan CO <sub>2</sub> dalam <i>Bicarbonated</i> CREA.....	16
Gambar 8. Efek CO <sub>2</sub> pada aliran darah kutaneus pada suhu perendaman yang berbeda.	17
Gambar 9. Contoh kasus efek perendaman terhadap pasien <i>Arteriosclerosis Obliterans</i>	18
Gambar 10. Perbandingan laju aliran darah pada air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	18
Gambar 11. Etiologi ALI.....	21
Gambar 12. Patofisiologi ALI.....	22
Gambar 13. Bagan tata laksana ALI.....	25
Gambar 14. Proses-proses yang terjadi pada neovaskularisasi.....	26
Gambar 15. Perbedaan angiogenesis, arteriogenesis, vaskulogenesis.....	27
Gambar 16. Perbandingan ligasi akut dengan kronis pada hewan coba dan penyakit iskemik pada manusia.....	28
Gambar 17. Tikus Wistar jantan.....	31
Gambar 18. Anatomi pembuluh darah tungkai tikus Wistar.....	32
Gambar 19. Berbagai metode <i>hind limb ischaemia</i> yang dapat dilakukan.....	32
Gambar 20. Alat dan bahan penelitian.....	40
Gambar 21. Aklimatisasi dan pembagian kelompok tikus pra-penelitian.....	41

Gambar 22. CREA, sumber air ( <i>wastafel</i> ), tabung CO <sub>2</sub> , dan pemanas air ( <i>water heater</i> ).....	41
Gambar 23. Injeksi IP dengan Ketamin HCl.....	42
Gambar 24. Arteri femoralis setelah dipisahkan dari vena dan nervus.....	42
Gambar 25. Ligasi arteri femoralis proksimal dan distal dengan benang silk 3.0.....	43
Gambar 26. Pemberian salep antibiotik pada luka bekas jahitan.....	43
Gambar 27. Skor Tarlov = 3, Skor Iskemik = 2.....	43
Gambar 28. Pengukuran suhu dan pH menggunakan termometer air raksa dan pHmeter.....	44
Gambar 29. Perendaman tikus dalam air biasa dan air CO <sub>2</sub> kadar tinggi.....	44
Gambar 30. Pengambilan sampel darah melalui vena lateralis pada ekor tikus.....	45
Gambar 31. Tungkai tikus yang telah dipotong setinggi lutut.....	45
Gambar 32. Tungkai bawah tikus setelah dipotong kemudian direndam dalam formalin 10%.....	46
Gambar 33. Preparat PA yang telah diwarnai dengan pewarnaan HE dan CD31.....	46
Gambar 34. Alat <i>sentrifuge</i> dan pengukur kadar SGOT dan LDH.....	47
Gambar 35. Perbandingan delta SGOT tikus tidak ligasi yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	53
Gambar 36. Perbandingan delta LDH tikus tidak ligasi yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	54
Gambar 37. Gambaran mikroskopik jaringan vaskular tikus tidak ligasi yang direndam air biasa (A) dengan air CO <sub>2</sub> (B).....	55
Gambar 38. Perbandingan jumlah vaskular tikus tidak ligasi yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	55

Gambar 39. Gambaran mikroskopik kerusakan otot skelet tikus tidak ligasi yang direndam air biasa (C) dengan air CO <sub>2</sub> (D).....	56
Gambar 40. Perbandingan skor kerusakan otot skelet tikus tidak ligasi yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	57
Gambar 41. Perbandingan delta SGOT tikus ligasi yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	58
Gambar 42. Perbandingan delta LDH tikus ligasi yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	59
Gambar 43. Gambaran mikroskopik jaringan vaskular tikus ligasi yang direndam air biasa (A) dengan air CO <sub>2</sub> (B).....	59
Gambar 44. Perbandingan jumlah vaskular tikus ligasi yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	60
Gambar 45. Gambaran mikroskopik kerusakan otot skelet tikus ligasi yang direndam air biasa (C) dengan air CO <sub>2</sub> (D).....	61
Gambar 46. Perbandingan skor kerusakan otot skelet tikus ligasi yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	61
Gambar 47. Perbandingan gambaran mikroskopik kerusakan otot skelet tikus tidak ligasi yang direndam air biasa (A) dengan air CO <sub>2</sub> (B) dan tikus ligasi yang direndam air biasa (C) dengan air CO <sub>2</sub> (D).....	66

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Etiologi ALI.....	20
Tabel 2. Klasifikasi Klinis ALI.....	24
Tabel 3. <i>Functional Scoring</i> .....	33, 48
Tabel 4. Kriteria skoring pada pemeriksaan histologi.....	35, 51
Tabel 5. Perbandingan kadar SGOT tikus tidak ligasi antara yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	53
Tabel 6. Perbandingan kadar LDH tikus tidak ligasi antara yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	54
Tabel 7. Perbandingan jumlah vaskular tikus tidak ligasi antara yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	55
Tabel 8. Perbandingan skor kerusakan otot skelet tikus tidak ligasi antara yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	56
Tabel 9. Perbandingan kadar SGOT tikus ligasi antara yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	57
Tabel 10. Perbandingan kadar LDH tikus ligasi antara yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	58
Tabel 11. Perbandingan jumlah vaskular tikus ligasi antara yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	59
Tabel 12. Perbandingan skor kerusakan otot skelet tikus ligasi antara yang direndam air biasa dengan air CO <sub>2</sub> .....	60

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Karbon dioksida (CO<sub>2</sub>) merupakan produk akhir metabolisme semua makhluk yang menggunakan oksigen (O<sub>2</sub>) sebagai sumber energi dan bahan dasar fotosintesis. CO<sub>2</sub> telah digunakan sebagai terapi dengan spektrum aplikasi yang luas (Hartmann et al. 2009). Sejak abad pertengahan, air asam dan gas yang memancar dari dalam tanah diakui secara efektif dapat menyembuhkan penyakit *St. Anthony`s Fire* yang disebabkan oleh keracunan ergot yang sering terjadi pada waktu itu (Hartmann et al. 2009). Di seluruh Eropa, mata air berkarbonasi telah digunakan sebagai balneoterapi (*natural bath spring*) bagi penderita hipertensi atau penyakit oklusi vaskular perifer. Beberapa literatur juga menyebutkan manfaat CO<sub>2</sub> sebagai terapi paliatif pada nyeri muskuloskeletal, intervensi terapeutik dan rehabilitasi penyakit rematik, serta dapat membantu penyembuhan pada dermatopati infeksius. Pada tahun 1834-1856, Piderit dan Beneke adalah orang yang pertama kali menggambarkan efek utama yang langsung didapatkan dari balneoterapi dengan menggunakan CO<sub>2</sub> pada bagian tubuh yang direndam, yaitu dapat memberikan sensasi kehangatan dan membuat kulit menjadi kemerahan atau *flushing (erythematous/hyperemic reaction)* (Schmidt, 2009).

Terapi CO<sub>2</sub> pertama kali diperkenalkan berupa spa pada tahun 1932. Metode terapeutik dengan menggunakan CO<sub>2</sub> yang diberikan secara transkutan ini ditujukan bagi pasien-pasien dengan gangguan vaskular perifer. Sejak saat itu, sejumlah penelitian berkembang, dimana sebagian besar berupa studi observasional yang menjelaskan efek CO<sub>2</sub> sebagai terapi dan bagaimana patofisiologinya. Banyak studi klinis telah menunjukkan keefektifan terapi CO<sub>2</sub> terhadap mikrosirkulasi (Schmidt, 2009).



Didukung dengan banyaknya penelitian yang telah membuktikan manfaat imersi CO<sub>2</sub> tersebut, maka suatu perusahaan dari Jepang telah berhasil membuat alat yang dapat menghasilkan air CO<sub>2</sub> kadar tinggi dengan suhu tertentu yang mudah digunakan untuk terapi sehari-hari. Alat tersebut bernama JESC CREA BC-2000 (JesC, 2013) yang telah digunakan pula di Indonesia, khususnya di Makassar.

Telah banyak penelitian klinis dan eksperimental yang menunjukkan manfaat terapi CO<sub>2</sub> pada penyakit arteri perifer yang mengalami iskemik (Ito et al., 1989; Hartmann et al., 1997, 2009; Nisihimura et al., 2002; Toriyama et al., 2002; Schmidt, 2009; Oe et al., 2011; Sakai et al., 2011; Ogoh et al., 2016; Dhalla et al., 2017; Xu et al., 2017), akan tetapi seluruh penelitian tersebut dilakukan pada *setting* kronis, yaitu *Peripheral Artery Disease* (PAD) dan *Chronic Limb Threatening Ischaemic* (CLTI). Masih diperlukan penelitian yang lebih ekstensif lagi untuk mengetahui manfaat dan mekanisme kerja CO<sub>2</sub> dalam memperbaiki mikrosirkulasi dan jaringan yang rusak, terutama yang mengalami iskemik akut.

Hingga karya tulis ini selesai disusun, belum pernah ada penelitian terdahulu yang meneliti efek terapi CO<sub>2</sub> pada penyakit arteri perifer akut/*Acute Limb Ischaemic* (ALI). ALI merupakan suatu kondisi kegawatdaruratan di bidang vaskular. Insidensi ALI diperkirakan 1,5 kasus dari 10.000 orang per tahun (Norgren et al., 2007). Sebanyak 10-16% penyakit vaskular di seluruh dunia disebabkan oleh ALI (Purushottam et al., 2014). Proses patologis dan faktor risiko yang menyebabkan kerusakan pembuluh darah ekstremitas memiliki banyak kesamaan dengan pembuluh darah jantung sehingga sebagian besar kasus ALI yang terjadi merupakan kombinasi keduanya. Seperti halnya pada kondisi infark miokard akut (IMA), reperfusi segera harus diterapkan dengan prinsip yang sama pada ALI (Ram dan George, 2017).

Meskipun telah banyak dicapai kemajuan dari segi pengobatan pada berbagai penyakit vaskular, baik berupa intervensi bedah/non-bedah maupun medikamentosa, namun hingga saat ini belum ada terapi ALI yang dianggap memuaskan (Dhalla dan Elimban, 2017). Komplikasi

ALI masih tergolong tinggi meskipun telah dilakukan upaya revaskularisasi dini, dimana amputasi terjadi pada 10-15% kasus dengan angka mortalitas mencapai 15-20%. Komplikasi mayor kardiovaskular seperti IMA, eksaserbasi gagal jantung kongestif, kerusakan fungsi ginjal, dan komplikasi pernafasan selama pasien ALI dirawat di rumah sakit juga sangat tinggi (Olinic et al., 2019; Ram dan George, 2017). Maka dari itu, perlu dikembangkan strategi baru untuk memperbaiki prognosis serta meningkatkan kualitas hidup pasien dengan penyakit arteri perifer, khususnya ALI (Xu et al., 2017).

Berdasarkan uraian di atas, maka peneliti tertarik untuk meneliti pengaruh rendaman air CO<sub>2</sub> kadar tinggi terhadap pembuluh darah perifer, baik dalam keadaan normal (non-iskemik) maupun kondisi ALI (iskemik akut) dengan menggunakan hewan coba tikus galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan normal dan yang dibuat ALI dengan metode *hind limb ischaemic* (HLI), yaitu dengan melakukan ligasi pada arteri femoralis tikus (Xu et al., 2017). Efek terapi CO<sub>2</sub> tersebut dinilai dengan menggunakan parameter kerusakan otot skelet, yaitu perubahan kadar *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT) dan *Lactat Dehydrogenase* (LDH) antara sebelum dengan setelah direndam air CO<sub>2</sub> kadar tinggi, serta pemeriksaan histopatologi dengan menghitung jumlah vaskular dan menilai derajat kerusakan jaringan otot skelet dengan menggunakan sistem skoring paska perendaman. Air biasa digunakan sebagai kontrol pada penelitian ini.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut: Apakah terdapat pengaruh rendaman air CO<sub>2</sub> kadar tinggi pada tikus galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan normal dan yang dibuat ALI terhadap perubahan parameter kerusakan otot (SGOT, LDH) dan gambaran histopatologi (jumlah vaskular dan derajat kerusakan otot skelet)?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1. Tujuan Umum

Mengetahui efek rendaman air CO<sub>2</sub> kadar tinggi pada kaki tikus galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan normal dan yang dibuat ALI

#### 2. Tujuan Khusus

- Membandingkan perubahan kadar SGOT pada tikus galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan normal antara yang direndam air biasa dengan air CO<sub>2</sub>
- Membandingkan perubahan kadar LDH pada tikus galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan normal antara yang direndam air biasa dengan air CO<sub>2</sub>
- Membandingkan jumlah vaskular tikus galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan normal setelah direndam air biasa dengan air CO<sub>2</sub>
- Membandingkan gambaran histopatologi jaringan otot skelet tikus galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan normal setelah direndam air biasa dengan air CO<sub>2</sub>
- Membandingkan perubahan kadar SGOT pada tikus galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan yang dibuat ALI antara yang direndam air biasa dengan air CO<sub>2</sub>
- Membandingkan perubahan kadar LDH pada tikus galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan yang dibuat ALI antara yang direndam air biasa dengan air CO<sub>2</sub>
- Membandingkan jumlah vaskular tikus galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan yang dibuat ALI setelah direndam air biasa dengan setelah direndam air CO<sub>2</sub>
- Membandingkan gambaran histopatologi jaringan otot skelet tikus galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan yang dibuat ALI setelah direndam air biasa dengan setelah direndam air CO<sub>2</sub>

#### **1.4 Hipotesis Kerja**

Terdapat pengaruh rendaman air CO<sub>2</sub> kadar tinggi pada tikus galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) jantan normal dan yang dibuat ALI terhadap perubahan parameter kerusakan otot (SGOT, LDH) dan histopatologi (jumlah vaskular, derajat kerusakan otot skelet yang dinilai dengan menggunakan skor kerusakan otot)

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

##### 1. Manfaat Pengembangan Ilmu

- Penelitian ini diharapkan dapat menambah khasanah ilmu pengetahuan dan menjadi bahan bacaan tentang pengaruh rendaman air CO<sub>2</sub> kadar tinggi, baik pada kondisi normal maupun iskemik, serta dalam membantu proses penyembuhan penyakit vaskular perifer, khususnya ALI
- Menjadi referensi tambahan untuk penelitian-penelitian lebih lanjut terkait manfaat perendaman air CO<sub>2</sub> kadar tinggi terhadap mikrosirkulasi pembuluh darah perifer, baik dalam kondisi normal maupun patologis, khususnya dalam kondisi ALI

##### 2. Manfaat Aplikatif

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat aplikatif sebagai bahan intervensi yang berguna dalam meningkatkan dan memperbaiki mikrosirkulasi pembuluh darah perifer yang dapat membantu proses penyembuhan ALI.

## BAB II

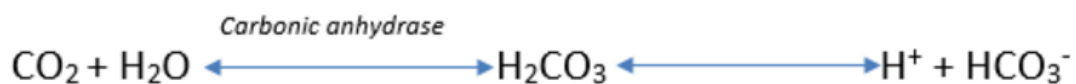
### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. KARBON DIOKSIDA (CO<sub>2</sub>)

##### 2.1 Sifat Kimia dan Fisika dari CO<sub>2</sub>

CO<sub>2</sub> merupakan atom karbon tunggal yang terikat pada dua atom oksigen oleh ikatan kovalen ganda sehingga membentuk molekul nonpolar. CO<sub>2</sub> memiliki sifat tidak berwarna dan tidak berbau sehingga secara visual tidak dapat dibedakan dengan udara serta 20 kali lebih larut dibandingkan dengan oksigen. (Cherniack et al., 1970).

CO<sub>2</sub> mempunyai peran penting dalam darah. Kadar CO<sub>2</sub> dalam darah diatur melalui transpor CO<sub>2</sub> ke paru-paru untuk kemudian dikeluarkan saat ekspirasi sehingga pH darah dapat terjaga.



**Gambar 1.** Reaksi pembentukan bikarbonat dalam tubuh (Loerting et al., 2010)

CO<sub>2</sub> yang larut dalam darah bereaksi dengan air membentuk asam karbonat (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Reaksi ini dikatalisis oleh enzim karbonik anhidrase sehingga terjadi sangat cepat (Forster dan N. Itada, 1980). Asam karbonat pada gilirannya dapat melepaskan ion hidrogen menjadi bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Gambar 1). Sebagian besar karbon dioksida dalam darah ditemukan dalam bentuk bikarbonat. Perubahan asam karbonat (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) menjadi ion hidrogen dan bikarbonat (H<sup>+</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) hampir terjadi secara spontan. Bila konsentrasi CO<sub>2</sub> meningkat, maka pH darah akan sedikit menurun atau menjadi sedikit lebih asam. Sejumlah kecil CO<sub>2</sub> terlarut menghasilkan sedikit kenaikan ion hidrogen yang mampu mengubah pH darah. Rasio antara CO<sub>2</sub> dan HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kira-kira 1:20. Setiap kenaikan 1 CO<sub>2</sub> membutuhkan 20 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> untuk mencegah perubahan pH darah dan melindungi tubuh dari peningkatan keasaman. Seperti yang

dijelaskan dalam reaksi di atas, hanya 1  $\text{HCO}_3^-$  yang dihasilkan dari setiap  $\text{CO}_2$  sehingga pH darah akan menjadi lebih asam karena kelebihan ion hidrogen. Oleh karena itu, dibutuhkan metode transportasi alternatif untuk mencegah asidosis berat setiap kali kita bernafas dan menghasilkan  $\text{CO}_2$  (Loerting et al., 2010).

## **2.2 Transpor $\text{CO}_2$ dalam Darah**

$\text{CO}_2$  merupakan produk sisa utama dari respirasi aerobik. Jumlah  $\text{CO}_2$  yang terlalu banyak atau terlalu sedikit dalam darah dapat menyebabkan konsekuensi yang serius sehingga diperlukan transportasi  $\text{CO}_2$  dalam darah yang berfungsi menjaga pH darah.  $\text{CO}_2$  dalam darah diangkut melalui 3 cara, yaitu berikatan dengan hemoglobin membentuk senyawa karbamino, sebagai ion bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ), dan sebagai  $\text{CO}_2$  terlarut (Geers et al., 2000).

### **2.2.1 Senyawa Karbamino**

Sekitar 30% dari semua  $\text{CO}_2$  diangkut sebagai senyawa karbamino. Pada konsentrasi tinggi,  $\text{CO}_2$  berikatan langsung dengan asam amino dan gugus amina hemoglobin (Hb) untuk membentuk senyawa karbaminohemoglobin. Pembentukan karbamino paling efektif terjadi di jaringan perifer, di mana produksi  $\text{CO}_2$  tinggi karena respirasi sel (Hsia CC, 1998).

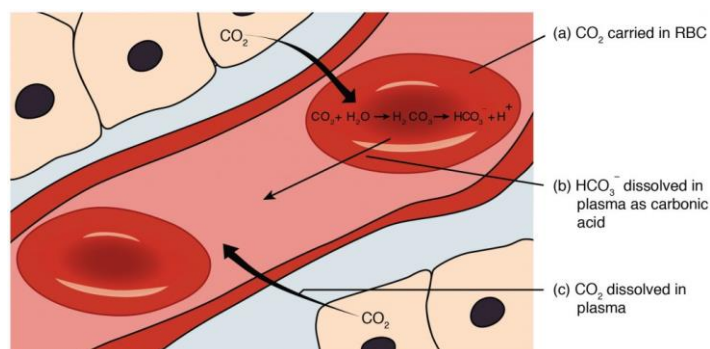
Efek Haldane juga berkontribusi pada pembentukan senyawa karbamino, yaitu bila konsentrasi  $\text{O}_2$  lebih rendah (seperti pada jaringan perifer aktif di mana  $\text{O}_2$  dikonsumsi), maka kapasitas pengangkutan  $\text{CO}_2$  dari darah meningkat. Hal ini terjadi karena pelepasan  $\text{O}_2$  dari Hb meningkatkan afinitas  $\text{CO}_2$  (Hsia CC, 1998; Geers et al., 2000). Ketika sel darah mencapai daerah konsentrasi tinggi  $\text{O}_2$  lagi (seperti paru-paru), maka  $\text{O}_2$  akan terikat lagi. Hal ini menyebabkan pelepasan  $\text{CO}_2$  (efek Haldane) yang memungkinkan lebih banyak  $\text{O}_2$  untuk diambil dan diangkut dalam darah (Jensen FB, 2004). Efek Haldane mencerminkan perbedaan kandungan  $\text{CO}_2$  antara hemoglobin teroksigenasi dengan tereduksi pada  $\text{PCO}_2$  yang sama. Efek

ini sebagian disebabkan oleh kemampuan hemoglobin untuk membuffer ion hidrogen dan sebagian disebabkan oleh daya ikat hemoglobin tereduksi dengan karbon dioksida yang 3,5 kali lebih efektif daripada oksihemoglobin (Geers et al., 2000).

### 2.2.2 Ion Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ )

Sekitar 60% dari semua  $\text{CO}_2$  diangkut melalui produksi ion  $\text{HCO}_3^-$  dalam sel darah merah.  $\text{CO}_2$  berdifusi ke dalam sel darah merah dan dikonversi menjadi  $\text{H}^+$  dan  $\text{HCO}_3^-$  oleh enzim karbonik anhidrase.  $\text{HCO}_3^-$  kemudian diangkut kembali ke dalam darah melalui penukar ion klorida-bikarbonat (*chloride shift*). Maka  $\text{HCO}_3^-$  dapat bertindak sebagai buffer terhadap hidrogen dalam plasma darah (Berend K et al., 2015).

Ion  $\text{H}^+$  yang dihasilkan dari reaksi karbonik anhidrase dalam sel darah merah berikatan dengan hemoglobin menghasilkan deoksihemoglobin. Hal ini berkontribusi pada efek Bohr, yaitu pelepasan  $\text{O}_2$  dari hemoglobin yang terjadi pada jaringan yang aktif, dimana konsentrasi  $\text{H}^+$  lebih tinggi. Hal ini juga mencegah hidrogen memasuki darah yang dapat menurunkan pH, sehingga kestabilan pH dapat terjaga (Berend K et al., 2015).



**Gambar 2.** Transpor  $\text{CO}_2$  dalam darah (Berend K et al., 2015)

Ketika sel-sel darah merah mencapai paru-paru,  $\text{O}_2$  berikatan dengan hemoglobin dan terjadi pelepasan ion  $\text{H}^+$ . Ion hidrogen ini menjadi bebas bereaksi dengan ion bikarbonat untuk menghasilkan  $\text{CO}_2$  dan  $\text{H}_2\text{O}$ , dan kemudian  $\text{CO}_2$  dihembuskan melalui paru-paru. Dengan

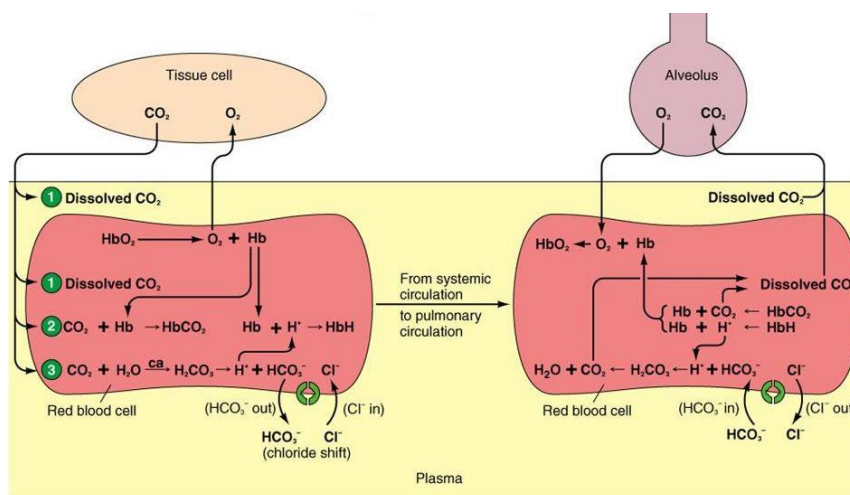
demikian, konsentrasi  $O_2$  yang tinggi mengurangi kapasitas darah dalam mengangkut  $CO_2$  (Hsia CC, 1998; Geers et al., 2000).

### 2.2.3 Senyawa Terlarut dalam Plasma

Sekitar 10% dari semua  $CO_2$  diangkut sebagai senyawa terlarut dalam plasma.  $CO_2$  sangat larut dalam air dibandingkan  $O_2$ . Meskipun kelarutannya tinggi, namun hanya sebagian kecil dari total  $CO_2$  dalam darah yang benar-benar diangkut sebagai senyawa terlarut dalam plasma (Geers et al., 2000; Forster R. E dan N. Itada, 1980).

Tekanan parsial  $CO_2$  lebih tinggi pada jaringan perifer dan lebih rendah di alveoli. Hal ini menyebabkan lebih banyak  $CO_2$  yang terlarut di jaringan perifer dan dilepaskan dalam bentuk gas di alveoli (Geers et al., 2000; Forster R. E dan N. Itada, 1980).

Ringkasan transpor aktif  $CO_2$  dalam menjaga pH darah dapat dilihat pada Gambar 3 berikut ini:



**Gambar 3.** Transpor aktif  $CO_2$  dalam menjaga pH darah (Loerting et al., 2010)

### 2.3 Efek Fisiologis $CO_2$ pada Pembuluh Darah Perifer

$CO_2$  merupakan hasil akhir dari metabolisme aerobik. Bila metabolisme meningkat, maka jumlah  $CO_2$  yang dihasilkan juga akan meningkat. Metabolisme yang berlangsung aktif dan terus-menerus memerlukan kecukupan *supply* oksigen dalam darah. Kecepatan aliran



darah bergantung pada kebutuhan metabolisme. Kadar CO<sub>2</sub> yang tinggi menandakan ketidakcukupan *supply* darah pada jaringan. Bila keadaan ini berlangsung terus menerus, maka akan merangsang pembentukan pembuluh darah baru untuk memenuhi kecukupan aliran darah pada jaringan. Sebagai contoh spesifik, stimulasi aktivitas metabolisme aerobik pada otot skelet akan membentuk pembuluh darah baru. Beberapa penelitian mengatakan, peningkatan kadar CO<sub>2</sub> pada otot akan meningkatkan faktor-faktor biologis yang dapat merangsang pembentukan sel otot dan pembuluh darah baru, sehingga pelepasan CO<sub>2</sub> pada metabolisme menjadi sangat penting untuk pembentukan pembuluh darah dan jaringan baru yang sangat diperlukan pada proses penyembuhan luka (Tune JD et al., 2002). Perlu dicatat bahwa mekanisme pembentukan pembuluh darah baru karena kebutuhan metabolisme berbeda dengan mekanisme pembentukan pembuluh darah yang terjadi dalam kondisi iskemik, dimana metabolisme berlangsung secara anaerobik dan terbentuk pula asam laktat. Dalam kondisi iskemik, pembuluh darah baru yang terbentuk dalam kondisi anaerobik berkompetisi dengan mekanisme yang berhubungan dengan kematian sel/apoptosis dan melibatkan berbagai mediator inflamasi yang pada akhirnya menyebabkan fibrosis dan terbentuknya jaringan parut. Hal ini sangat berbeda dengan pembentukan pembuluh darah baru pada metabolisme aerobik yang menstimulasi terbentuknya jaringan baru yang sehat (Hudlicka O et al., 1984).

Beberapa studi menunjukkan bahwa CO<sub>2</sub> dapat meningkatkan aliran darah pada jaringan (Carr P et al., 1993). Peningkatan aliran darah kutaneus merupakan kunci stimulus fisiologis untuk meningkatkan vasodilatasi mikrosirkulasi karena dapat meningkatkan *shear stress* pada dinding pembuluh darah serta meningkatkan fungsi endotel sebagai vasodilator (Naylor et al., 2011). CO<sub>2</sub> merupakan *messenger* pertama sel otot polos. CO<sub>2</sub> membuat asidosis ekstraseluler sehingga kanal kalium terbuka dan terjadi hiperpolarisasi. Keadaan ini juga mengaktivasi kanal kalsium dan membuat kadar kalsium intrasel berkurang sehingga terjadi vasodilatasi (Hasyar et al., 2020). Teori Jordan mengatakan bahwa CO<sub>2</sub> dapat berdifusi ke

dalam jaringan subkutan, mempengaruhi mikrosirkulasi dengan menurunkan pH seluler yang membuat kontraktibilitas sel otot polos pembuluh darah menurun dan menyebabkan vasodilatasi.  $PCO_2$  dapat ditingkatkan dengan pemberian air yang mengandung kadar tinggi  $CO_2$  pada kulit (Ito et al., 1989).

#### **2.4 Peran $CO_2$ pada Penyakit Pembuluh Darah Perifer**

Penyakit arteri perifer menyebabkan aliran darah berkurang sehingga terjadi hipoksia jaringan. Rendahnya kadar  $O_2$  akan meningkatkan HIF yang menyebabkan translasi dari protein yang berfungsi melindungi sel selama hipoksia, sehingga pada akhirnya terjadi apoptosis (Gao L et al., 2012). Proses ini juga menyebabkan inflamasi (nyeri dan bengkak).  $CO_2$  yang diberikan secara transkutan dapat meningkatkan aliran darah dan oksigenasi jaringan, menurunkan konsentrasi HIF1alfa (Selfridge AC et al., 2016), dan secara langsung menurunkan senyawa biologis utama yang mengontrol inflamasi, yaitu NFkB. Mekanisme kerja ini serupa dengan obat anti-inflamasi, misalnya aspirin (Keogh CE et al., 2017).

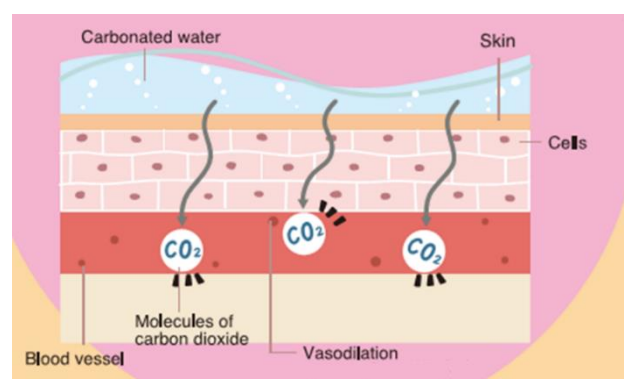
Inflamasi merupakan suatu proses metabolik aktif dimana dihasilkan banyak sel radang, enzim-enzim, serta sitokin oleh jaringan yang meradang. Hal ini akan meningkatkan kebutuhan  $O_2$ . Hipoksia yang terjadi karena meningkatnya kebutuhan  $O_2$  akibat peradangan akan diperburuk dengan adanya gangguan transpor  $O_2$ . Keadaan ini terjadi terutama pada peradangan kronis, dimana kombinasi antara inflamasi yang berkepanjangan akan membentuk jaringan fibrosis dan trombosis yang pada akhirnya menurunkan aliran darah dan suplai  $O_2$ . Oleh karena itu, peningkatan konsumsi  $O_2$  dan infiltrasi sel-sel imun pada daerah peradangan disertai dengan disfungsi pembuluh darah yang mengganggu suplai  $O_2$  akan merusak jaringan selama terjadi inflamasi kronis (Flück K dan Fandrey J, 2016).

$CO_2$  dapat meningkatkan konsentrasi  $O_2$  dalam jaringan dan secara langsung dapat meningkatkan kecepatan aliran darah melalui vasodilatasi kapiler (Ito et al., 1989).  $CO_2$  yang

dilepaskan jaringan sebagai produk akhir metabolisme akan memasuki aliran darah dan diabsorpsi oleh sel darah merah. Di dalam sel darah merah, sebagian akan berubah menjadi asam karbonat dan berikatan dengan hemoglobin yang pada akhirnya akan menyebabkan pelepasan  $O_2$  dari hemoglobin. Dilepaskannya  $O_2$  karena  $CO_2$  inilah yang dikenal sebagai efek Bohr (Sakai Y et al., 2011). Kondisi lingkungan yang menguntungkan untuk pelepasan  $O_2$  adalah suhu tinggi, konsentrasi  $CO_2$  yang tinggi, dan pH rendah atau lingkungan asam. Semua kondisi ini menyebabkan kurva disosiasi  $O_2$ , yang menunjukkan kemampuan pelepasan  $O_2$ , bergeser ke kanan, artinya hemoglobin melepaskan  $O_2$  lebih mudah dari biasanya, sehingga lebih banyak  $O_2$  yang masuk ke dalam sel. Bila kadar  $O_2$  tinggi dalam sel, maka metabolisme sel diaktifkan sehingga kemampuan regenerasi sel menjadi lebih tinggi.  $CO_2$  dapat dengan mudah mencapai pembuluh darah melalui penyerapan kulit dan mudah larut dalam darah sehingga hemoglobin melepaskan lebih banyak  $O_2$ . Semakin tinggi konsentrasi  $CO_2$ , maka semakin kuat efeknya (Oe K et al., 2011).

## 2.5 Difusi $CO_2$ Melalui Kulit

$CO_2$  merupakan molekul yang sangat kecil yang dapat berdifusi secara cepat sesuai dengan gradien konsentrasi.  $CO_2$  sangat larut dalam air (20 kali lebih larut dibandingkan  $O_2$ ) (Sutton I, 2015; Jakobsen M dan Bertelsen G, 2006). Kecepatan difusi meningkat 2-4 kali lipat dalam kondisi basah (Bedu M et al., 1989).



**Gambar 4.** Difusi  $CO_2$  melalui kulit hingga mencapai mikrosirkulasi (JesC, 2013)

Jaringan target terapi CO<sub>2</sub> adalah kulit, jaringan lunak, dan sendi. Gas CO<sub>2</sub> dapat menembus kulit, berdifusi ke dalam jaringan yang diinginkan, dan bergerak menuju konsentrasi yang lebih rendah untuk mencapai mikrosirkulasi di mana ia dapat memberikan efek terapeutiknya (Shaw et al., 1992).

## **2.6 Penggunaan CO<sub>2</sub> dalam Praktik Klinis**

Savin, dkk melaporkan bahwa transfer CO<sub>2</sub> melalui kulit memiliki efek vasomotor lokal yang bermanfaat (Savin E et al., 1995). Hartmann, dkk mengatakan bahwa peningkatan kadar O<sub>2</sub> jaringan disebabkan oleh efek Bohr selain efek vasodilatasi oleh CO<sub>2</sub> dan penurunan kadar katekolamin plasma (Hartmann et al., 1997). Toriyama, dkk juga melaporkan bahwa efek air yang diperkaya CO<sub>2</sub> pada mikrosirkulasi subkutan menyebabkan vasodilatasi perifer yang dihasilkan dari peningkatan aktivitas saraf parasimpatis dan penurunan saraf simpatis (Toriyama T et al., 2002). Studi pada sirkulasi koroner dan aorta menyebutkan bahwa vasodilatasi yang terjadi sebagai respons terhadap CO<sub>2</sub> dimediasi sebagian oleh NO (Fukuda S et al., 1990).

Terapi CO<sub>2</sub> sebagian besar diberikan secara transkutan/topikal dalam bentuk air rendaman yang mengandung CO<sub>2</sub> konsentrasi tinggi (imersi). Selain itu, CO<sub>2</sub> dapat pula diberikan dalam bentuk *hydrogel* (Sakai Y et al., 2011). CO<sub>2</sub> dalam bentuk gas sangat jarang digunakan karena sulitnya mengontrol kadar gas yang diperlukan. Pemberian terapi gas CO<sub>2</sub> dalam bentuk inhalasi hanya untuk kepentingan penegakkan diagnosis dan penelitian semata (Ito T, 1989).

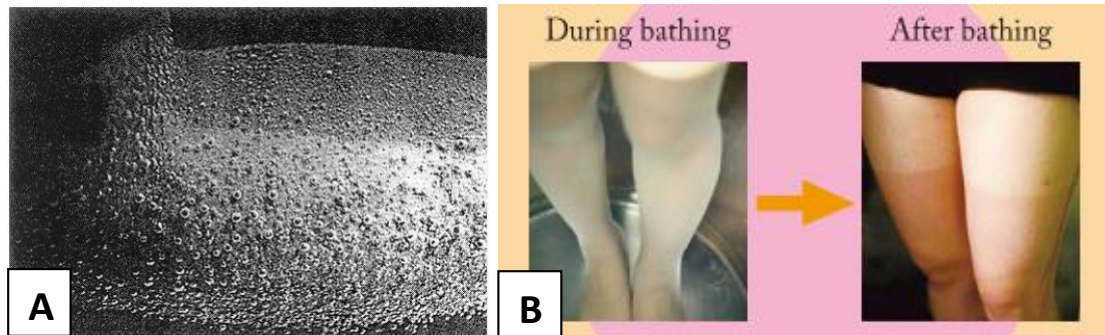
## **2.7 Rendaman Air CO<sub>2</sub> Kadar Tinggi (Imersi)**

Di Eropa, perendaman dengan air dan CO<sub>2</sub> telah digunakan untuk mengobati hipertensi dan penyakit oklusi arteri perifer (Nishimura et al., 2002). Bahkan, penggunaan CO<sub>2</sub> dalam

dunia medis telah dibuktikan melalui teknik pencitraan pada hewan coba dan telah dibuktikan bahwa CO<sub>2</sub> aman dan dapat ditoleransi dengan baik oleh tubuh. Namun, teknik dan pemahaman sifat CO<sub>2</sub> harus dikuasai dengan baik (Cho, 2015).

Telah banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui manfaat pemberian CO<sub>2</sub> secara transkutan, dan secara signifikan diperoleh hasil bahwa CO<sub>2</sub> dapat meningkatkan aliran darah, merangsang angiogenesis, dan meningkatkan oksigenasi jaringan, bahkan lebih baik daripada oksigen itu sendiri (Xu Y et al., 2017). Perlu diketahui pula bahwa CO<sub>2</sub> memiliki sifat bakteristatik sehingga bakteri tidak akan bermultiplikasi pada lingkungan yang mengandung CO<sub>2</sub>. Hal ini memungkinkan terapi CO<sub>2</sub> dapat digunakan untuk mengobati penyakit yang disebabkan oleh sirkulasi darah yang buruk (Xu Y et al., 2017), seperti pada penderita PAD, kaki diabetik dengan ulkus atau gangren yang disertai hilangnya jari-jari dan ekstremitas, bahkan dapat mengurangi gejala yang disebabkan penyakit Raynaud (Toriyama T et al., 2002).

Terdapat 2 efek yang diperhatikan dan meninggalkan kesan selama perendaman, yaitu gelembung air yang tak terhitung jumlahnya di permukaan kulit dan warna kulit yang memerah (bisa jelas dibedakan dari bagian tubuh yang tidak direndam CO<sub>2</sub>). Gelembung air tersebut adalah gelembung air berkarbonasi yang menempel pada kulit seperti bulu halus/"sikat gas." Efek kedua adalah kemerahan pada kulit yang dapat dilihat pada imersi air CO<sub>2</sub> dengan konsentrasi 300-400 ppm. Fenomena ini dipengaruhi oleh suhu air perendaman yang menyebabkan dilatasi arteriol prekapiler dan kapiler. CO<sub>2</sub> juga dapat menghambat reseptor dingin di kulit dan menstimulasi reseptor hangat. Air tawar terasa dingin pada suhu 33°C, sedangkan dalam rendaman CO<sub>2</sub> tidak terasa dingin pada suhu yang sama. Efek langsung dari rendaman CO<sub>2</sub> juga dapat menurunkan laju jantung dan pernapasan (Schmidt KL, 2009).



**Gambar 5.** Efek perendaman CO<sub>2</sub>: (A) membentuk “sikat gas” (Schmidt KL, 2009), (B) kulit memerah pada bagian yang direndam (JesC, 2013)

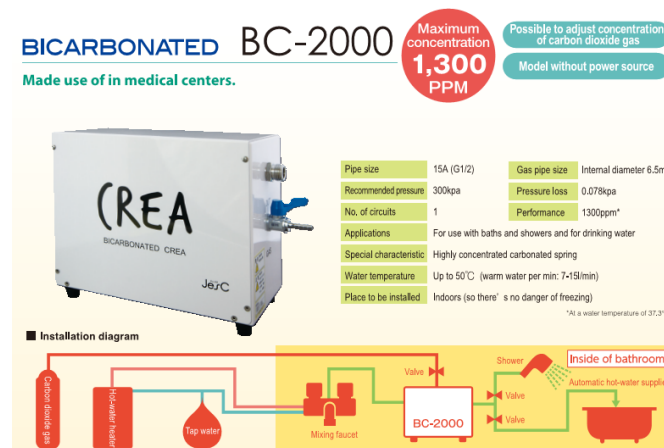
Terdapat beberapa faktor yang perlu diperhatikan saat terapi imersi dengan menggunakan air rendaman kaya CO<sub>2</sub> ini karena dapat mempengaruhi hasil akhir. Faktor-faktor tersebut antara lain: konsentrasi CO<sub>2</sub>, suhu, dan waktu (durasi dan frekuensi perendaman) (Ito T, 1989).

### 2.7.1 Pengaruh Konsentrasi CO<sub>2</sub>

Efek dari aplikasi CO<sub>2</sub> sangat dipengaruhi oleh konsentrasinya. Kadar terendah CO<sub>2</sub> untuk dapat menimbulkan efek terapeutik adalah 400 mg CO<sub>2</sub>/kg air (= 400 ppm). Efek akan meningkat secara linier hingga 1.400 mg CO<sub>2</sub>/kg air (= 1.400 ppm). Bila kadarnya lebih tinggi dari itu, maka tidak akan menimbulkan efek (Bauer C, 1980).

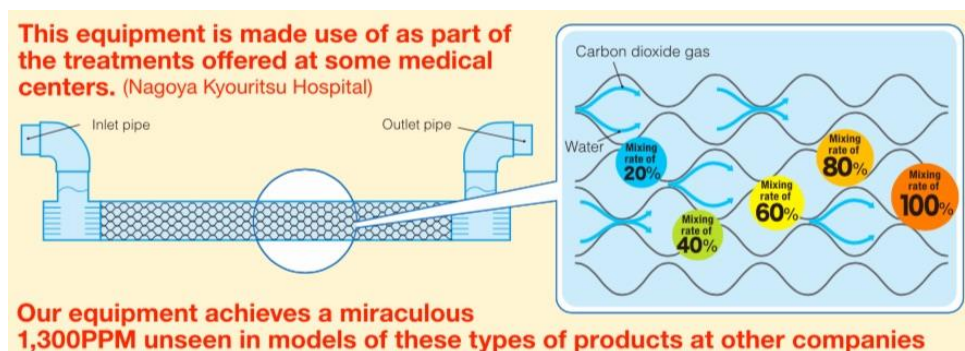
Didukung dengan banyaknya penelitian yang telah membuktikan manfaat imersi air dengan kandungan CO<sub>2</sub> konsentrasi tinggi, khususnya bagi penderita penyakit pembuluh darah perifer, maka banyak perusahaan terutama di negara Jepang dan Eropa berlomba-lomba untuk membuat suatu alat yang dapat menghasilkan campuran air dengan CO<sub>2</sub> kadar tinggi yang mudah digunakan untuk terapi sehari-hari. Saat ini telah ditemukan alat yang dapat menghasilkan air CO<sub>2</sub> kadar tinggi hingga 1.300 ppm, dimana sumber air dengan konsentrasi lebih dari 1.000 ppm diklasifikasikan sebagai sumber air berkarbonasi tinggi. Alat tersebut

dibuat oleh salah satu perusahaan dari Jepang, dan telah digunakan pula di Indonesia, khususnya di Makassar. Alat tersebut bernama JESC CREA BC-2000 (JesC, 2013).



**Gambar 6.** CREA BC-2000 (JesC, 2013)

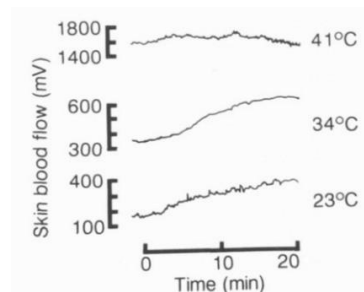
CREA diciptakan untuk mencampurkan dua senyawa yang berbeda fisiknya, yaitu air dan gas. Alat ini memiliki membran komposit tiga lapis dengan serat berongga. Membran tersebut terdiri dari film ultra tipis non-berpori dengan permeabilitas selektif terhadap gas yang terletak di antara 2 lapisan. Lapisan tengah membran memungkinkan gas seperti oksigen, nitrogen, dan karbon dioksida dapat melewatinya, namun tidak dapat dilalui oleh air. Di dalam alat tersebut, pada saluran yang terpisah dialirkan air dengan suhu tertentu. Saluran air tersebut dikelilingi oleh membran yang ketika menerima karbon dioksida bertekanan tinggi, maka gas CO<sub>2</sub> akan berdifusi melalui struktur molekul film tipis dari membran tersebut dan larut ke dalam air menuju tekanan lebih rendah sehingga mengeluarkan air yang kaya akan CO<sub>2</sub> (Aratel Group, 2012).



**Gambar 7.** Penggabungan air dan CO<sub>2</sub> dalam CREA (JesC, 2013)

### 2.7.2 Pengaruh Suhu

Aktivitas CO<sub>2</sub> juga menunjukkan respon terhadap efek termal (Nishimura et al., 2002). Berdasarkan kesimpulan dari beberapa hasil studi mengatakan bahwa aplikasi imersi campuran air dan CO<sub>2</sub> pada suhu tertentu dapat meningkatkan aliran darah dan tekanan oksigen (PO<sub>2</sub>) (Hartmann et al., 1997). Pada suhu 34°C didapatkan peningkatan absolut laju aliran darah kutaneus 2 kali lipat lebih baik dibandingkan pada suhu 23°C. Sebaliknya, pada suhu 41°C efek CO<sub>2</sub> terhadap laju aliran darah kutaneus sangat kurang. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ada suhu tertentu dimana CO<sub>2</sub> dapat memberikan efek yang besar pada laju aliran darah kutaneus. Penyebab CO<sub>2</sub> memberikan dampak yang besar pada suhu 34°C karena suhu tersebut sangat dekat dengan suhu netral yang dapat membantu menyembuhkan luka dan ulkus kronik (Ito T dan Moore JI, 1989).



**Gambar 8.** Efek CO<sub>2</sub> pada aliran darah kutaneus pada suhu perendaman yang berbeda (Ito T dan Moore JI, 1989)

Peningkatan aliran darah kutaneus sangat penting karena merupakan kunci stimulus fisiologis untuk meningkatkan fungsi vasodilator mikrosirkulasi. Termoregulasi pada vasodilatasi kutaneus memicu peningkatan *shear stress* di *conduit artery* dan meningkatkan fungsi endothelial sebagai vasodilator (Ogoh et al., 2016).

### 2.7.3 Pengaruh Waktu (Durasi dan Frekuensi)

Terapi dengan merendam ekstremitas dengan gangguan pembuluh darah perifer (PAD, kaki diabetik, ulkus, gangren) pada air CO<sub>2</sub> kadar tinggi kurang dirasakan manfaatnya bila

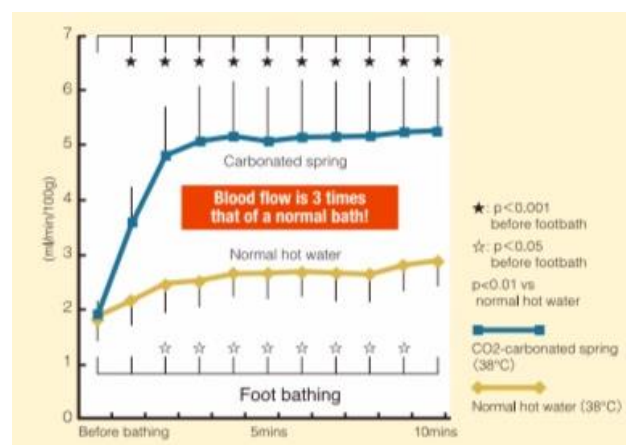


hanya direndam satu kali. Efek permanen yang diharapkan akan dicapai bila perendaman dilakukan secara berulang karena dibutuhkan waktu untuk pembentukan pembuluh darah baru sehingga dapat memperbaiki suplai oksigen ke jaringan dan secara permanen menurunkan inflamasi (Toriyama T et al., 2002). Berikut ini adalah contoh kaki penderita *Arteriosclerosis Obliterans* yang secara berkala menjalani intervensi perendaman kaki dalam campuran air CO<sub>2</sub> dan hasilnya memberikan perbaikan jaringan yang sangat signifikan dalam 1 tahun terapi (JesC, 2013).



**Gambar 9.** Contoh kasus efek perendaman terhadap pasien *Arteriosclerosis Obliterans* (JesC, 2013)

Perendaman air CO<sub>2</sub> dapat meningkatkan aliran darah mencapai 200-250% dari nilai pra imersi. Kecepatan peningkatan aliran darah kutaneus terlihat paling besar selama 10 menit pertama, setelah itu mulai berkurang. Hal ini sangat kontras dengan perendaman dalam air murni yang menunjukkan tidak adanya peningkatan aliran darah kutaneus yang signifikan seperti yang tampak pada gambar di bawah ini (Nishimura et al., 2002).



**Gambar 10.** Perbandingan laju aliran darah pada air biasa dengan air CO<sub>2</sub> (JesC, 2013)

Rendaman air CO<sub>2</sub> hanya berefek lokal pada bagian tubuh yang direndam. Sebagian besar CO<sub>2</sub> akan terlarut dalam jaringan yang direndam, sebagian kecil sisanya akan ikut aliran darah untuk kemudian dilepaskan dalam bentuk gas melalui paru-paru pada saat ekspirasi. Di dalam tubuh juga terdapat mekanisme transpor aktif untuk menjaga keseimbangan pH darah. Bila organ-organ tersebut berfungsi normal, maka tidak akan terjadi toksisitas akibat rendaman lokal dengan menggunakan air CO<sub>2</sub> (Shaw et al., 1992; Hartmann et al., 1997; Toriyama T et al, 2002).

## **2.8 Indikasi Dan Kontra Indikasi Terapi CO<sub>2</sub>**

Indikasi dari terapi CO<sub>2</sub> antara lain gangguan mikrosirkulasi kutaneus, hipertensi arteriolar, insufisiensi vena, gagal jantung ringan-sedang (*functional class I-II*), nyeri fibromuskular, dan pada keadaan dimana latihan otot tidak mungkin dilakukan atau tidak adekuat (Xu Y et al., 2017). Kontraindikasi terapi CO<sub>2</sub> pada keadaan hiperkapnia, terutama bila dilakukan perendaman pada seluruh tubuh, sedangkan hipotensi hingga saat ini masih diperdebatkan (Xu Y et al., 2017).

## **B. ACUTE LIMB ISCHAEMIC (ALI)**

### **2.9 Pengertian ALI**

ALI merupakan suatu kondisi dimana terjadi penurunan perfusi pada ekstremitas secara tiba-tiba yang dapat mengancam viabilitas ekstremitas yang terkena sehingga dibutuhkan penanganan segera. Kondisi ini dikatakan akut bila terjadi dalam waktu kurang dari 14 hari dari onset munculnya gejala (Creager et al., 2012). Perburukan gejala dapat terjadi dalam hitungan jam hingga hari, mulai dari episode klaudikasio intermiten hingga rasa nyeri pada ekstremitas yang terkena saat istirahat (*resting pain*), parestesia, kelemahan otot, kelumpuhan pada ekstremitas yang terkena, bahkan gangren. Pada pemeriksaan fisik didapatkan tidak

adanya pulsasi di daerah distal dari oklusi, kulit teraba dingin dan pucat, penurunan fungsi sensoris, dan penurunan kekuatan otot (Ram dan George, 2017).

Berbeda dengan *chronic limb-threatening ischemia* (CLTI) dimana telah terbentuk pembuluh darah kolateral, pada ALI belum terbentuk kolateral sebagai kompensasi dari hilangnya perfusi karena waktu terjadinya sangat singkat sehingga viabilitas ekstremitas yang terkena menjadi terancam. Keadaan iskemik mendadak ini mempengaruhi seluruh jaringan yang secara aktif bermetabolisme, seperti kulit, otot, dan saraf. Maka dari itu, diagnosis dan tata laksana segera sangat diperlukan untuk menyelamatkan ekstremitas yang terkena serta menghindari komplikasi sistemik yang dapat mengganggu fungsi organ lain sehingga risiko kematian dapat menurun (Olinic et al., 2019).

## 2.10 Etiologi ALI

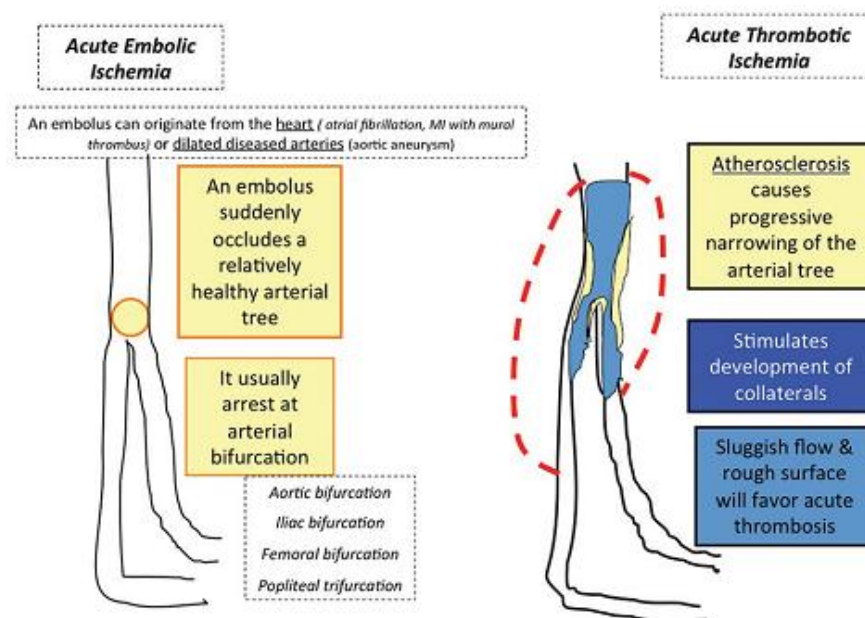
Penyebab ALI dapat diklasifikasikan menjadi 3 kategori, yaitu kausa emboli (40%), thrombosis (50%), dan lain-lain (10%) seperti dapat dilihat pada Tabel 1 berikut ini:

**Tabel 1.** Etiologi ALI (Purushottam et al., 2014)

<b>EMBOLI (40%)</b>	<b>THROMBOTIK (50%)</b>	<b>PENYEBAB LAIN (10%)</b>
<b>Sumber dari jantung (80%)</b>	<b>Berhubungan dengan PAD</b>	Trauma arteri
Atrial fibrilasi	Ruptur plak <i>de novo</i> (30%)	Diseksi aorta
Thrombus ventrikel kiri	Thrombosis stent/ <i>graft</i> (70%)	Arteriopati HIV
<i>Myxoma</i> atrium kiri	Thrombus pada aneurisma	Sindrom kompartemen
Penyakit katup jantung	<b>Tidak berhubungan dengan PAD</b>	<i>Phlegmasia cerulea dolens</i>
- Infektif endokarditis	Arteritis dengan thrombosis	Kompresi eksternal
- Thrombosis katup prostetik	- <i>Giant cell arteritis</i>	
- Penyakit katup rematik	- <i>Thrombangitis obliterans</i>	
Paradoksikal emboli	Hipercoagulabilitas	
<b>Sumber dari vaskular</b>	- Sindrom antifosfolipid	
Aneurisma	- Keganasan	
Plak atherosklerosis	Ergotisme	
<b>Terkait prosedur</b>	Vasospasme	
<i>Coronary artery bypass</i>	Kokain	
Prosedur endovaskular	Vasopresor	
<b>Lain-lain</b>		
Udara		
Air ketuban		
Injeksi intra-arteri		

Oklusi yang ditimbulkan karena thrombosis biasanya terjadi pada pembuluh darah dengan lesi stenosis kronik akibat atherosklerosis sehingga sering disertai gejala PAD sebelumnya dan ditemukan adanya kolateral. Sekitar 15-20% pasien dengan PAD dapat berkembang menjadi ALI. Obstruksi akut terjadi akibat ruptur plak, kegagalan sirkulasi, atau pada kondisi hiperkoagulabilitas (Obara H et al., 2018). Thrombosis juga dapat disebabkan oleh oklusi pada *stent* dan *bypass graft* yang menjadi penyebab tersering saat ini mengingat semakin meningkatnya intervensi vaskular (Goldstein dan Mishkel, 2011).

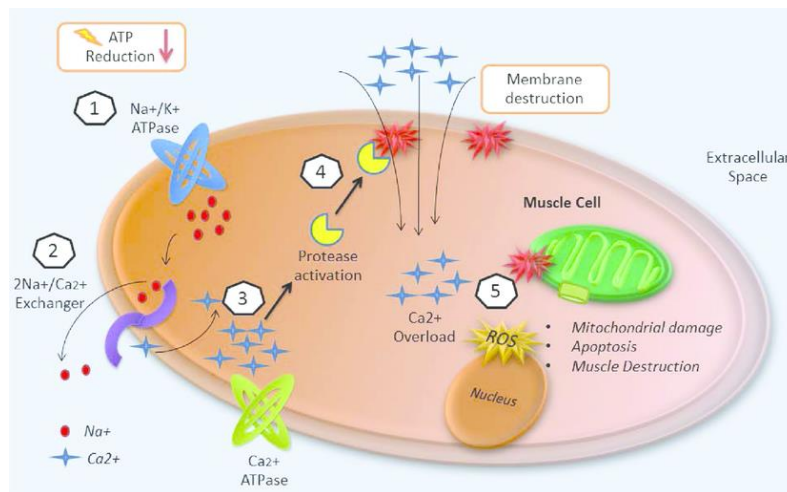
Sebanyak 90% emboli berasal dari kardiak yang biasanya disebabkan oleh atrial fibrilasi dan thrombus ventrikel kiri akibat infark miokard akut (IMA). Penyebab lain antara lain penyakit katup jantung seperti pada *post-valve replacement*, tumor kardiak/aorta, dan emboli paradoks (Obara H et al., 2018). Emboli cenderung menempel pada percabangan arteri seperti aortoiliaka, femoralis dan arteri poplitea distal (Ascher E, 2014). Bila emboli terjebak pada lesi stenotik akibat atherosklerosis, maka sulit dibedakan antara emboli dengan thrombosis. Penderita ALI kausa emboli memiliki pembuluh darah yang relatif sehat dan tidak ditemukan adanya kolateral, sehingga saat terjadi ALI, gejala yang muncul lebih mendadak dan berat (Goldstein dan Mishkel, 2011).



**Gambar 11.** Etiologi ALI (Ram dan George, 2017)

## 2.11 Patofisiologi ALI

ALI memicu serangkaian kejadian yang mengakibatkan kerusakan otot yang bersifat ireversibel dalam waktu sekitar 6 jam pada pasien yang tidak memiliki kolateral yang baik maupun kondisi patologis vaskular sebelumnya. ALI menyebabkan kapasitas untuk menghasilkan ATP dan cadangan ATP menjadi hilang sehingga terjadi akumulasi laktat. Kerusakan pompa natrium-kalium ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-ase) mengakibatkan kebocoran kalsium intraseluler. Peningkatan kadar kalsium yang persisten memicu sejumlah besar enzim yang diaktivasi oleh kalsium yang pada akhirnya menyebabkan nekrosis. Dengan hilangnya integritas membran sel dan mitokondria, maka terjadi proses kematian sel yang ireversibel (Purushottam et al., 2014).



**Gambar 12.** Patofisiologi ALI. (1) berkurangnya ATP menghambat fungsi pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase sehingga kadar  $\text{Na}^+$  intraselular meningkat. (2)  $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger meningkatkan kadar kalsium intraselular. (3)  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase tidak dapat memompa kalsium intraselular keluar karena kekurangan energi. (4) Kalsium intraselular mengaktifkan enzim protease seperti *phospholipase 2* (PLA2) yang merusak komponen struktural dari membran sel, membuat kalsium yang masuk semakin bertambah. (5) Kadar kalsium yang berlebihan merusak mitokondria dan merangsang apoptosis yang pada akhirnya membuat sel menjadi nekrosis (Chavez et al., 2016)

## 2.12 Presentasi Klinis ALI

Secara umum, pasien ALI memiliki gejala klasik yang dapat disingkat menjadi “6P”, yaitu *Pain*, *Pallor*, *Paralysis*, *Pulse deficit*, *Paresthesia*, dan *Poikilothermia* (Olinic et al.,

2019). Kejadian neurologik akut merupakan diagnosis banding tersering dari ALI karena keduanya dapat menyebabkan nyeri (*pain*), paralisis, dan parestesia. Tidak jarang ditemukan manifestasi klinis lanjut berupa kerusakan jaringan yang ireversibel akibat iskemik yang semula salah didiagnosis sebagai kejadian neurologik akut. Kekeliruan diagnosis ini mengakibatkan semakin buruknya prognosis karena waktu yang diperlukan untuk mencapai keberhasilan revaskularisasi akibat emboli akut sangat terbatas. Maka dari itu, pemeriksaan klinis yang teliti harus dilakukan untuk mencegah kejadian yang dapat berakibat fatal tersebut (Ram dan George, 2017).

Pada ALI kausa thrombosis biasanya didahului adanya keluhan *claudicatio intermitten* atau riwayat revaskularisasi sebelumnya pada ekstremitas yang terkena. Selain itu, ditemukan pula komorbid kardiovaskular yang signifikan, seperti penyakit jantung koroner, riwayat stroke, diabetes, merokok, hipertensi, dislipidemia, riwayat keluarga, dan gagal ginjal kronik (Fukuda et al., 2015). Komplikasi thrombosis akibat plak atherosklerosis akan membuat onset serta gejala menjadi tidak jelas. Progresivitas dari atherosklerosis sering diikuti dengan pembentukan pembuluh darah kolateral ke arah distal, sehingga ketika terjadi oklusi akut tidak menimbulkan gejala iskemik yang menonjol. Akan tetapi, penyebaran thrombus dapat menimbulkan iskemik yang luas (Olinic et al., 2019).

Oklusi akut akibat emboli patut dicurigai bila onset terjadinya tiba-tiba dengan derajat nyeri yang hebat karena belum terbentuk pembuluh darah kolateral, riwayat emboli sebelumnya, aritmia terutama atrial fibrilasi, diketahui terdapat sumber emboli (jantung, aneurisma) dan tidak terdapat riwayat *claudicatio intermitten* (Creager et al., 2012). Oklusi akut pada arteri akan menyebabkan spasme pembuluh darah dan membuat ekstremitas yang terkena tampak berwarna keputihan seperti marmer. Beberapa jam kemudian, pembuluh darah relaksasi, kulit terisi darah miskin oksigen (deoksigenasi) yang mengakibatkan bintik-bintik yang memucat ketika ditekan (Acar et al., 2013).

### 2.13 Klasifikasi ALI dan Manfaatnya dalam Menentukan Terapi Serta Prognosis

Klasifikasi ALI yang paling sering digunakan adalah klasifikasi berdasarkan Rutherford (Tabel 2). Klasifikasi Rutherford ini terdiri dari pemeriksaan klinis yang meliputi warna kulit, pengisian vena, fungsi sensorik dan motorik, serta ada tidaknya signal pada arteri dan vena ekstremitas yang terlibat yang didapatkan saat pemeriksaan Doppler vaskular (Rutherford et al., 2001). Ketika diagnosis ALI ditegakkan, maka heparin intravena harus segera diberikan untuk meminimalisir pembentukan thrombus dan menyelamatkan mikrosirkulasi. Analgetik juga dapat diberikan untuk meredakan nyeri (Norgren et al., 2007).

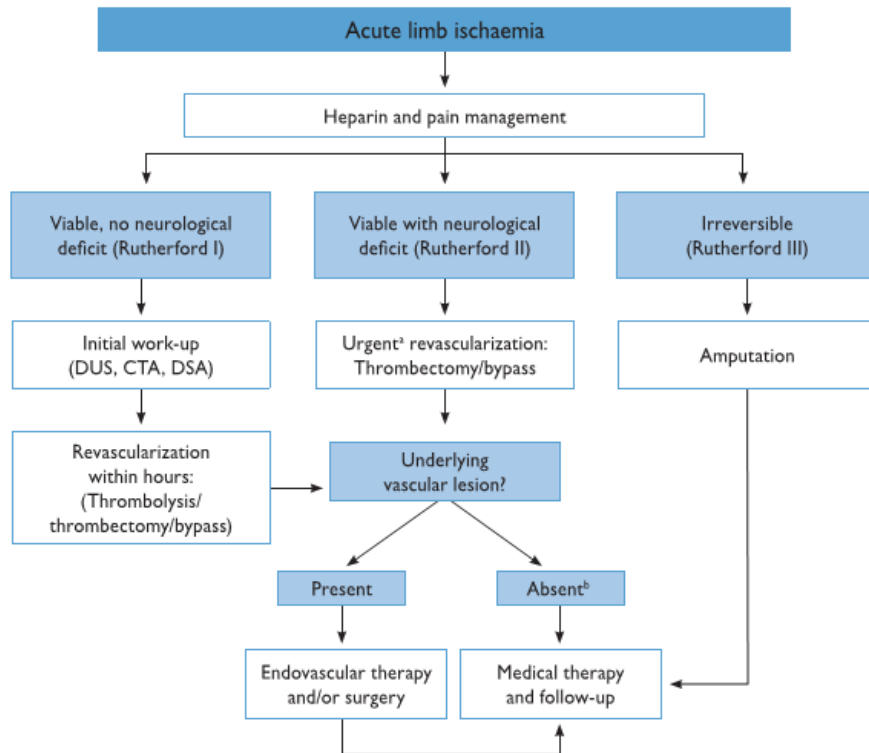
**Tabel 2.** Klasifikasi Klinis ALI (Rutherford et al., 2001)

Derajat	Deskripsi	Temuan Klinis		Signal Doppler	
		Gangguan sensoris	Gangguan motorik	Arteri	Vena
I	<i>Viable</i> , tidak segera mengancam	Tidak ada	Tidak ada	Terdengar	Terdengar
Ila	Terancam, bisa diselamatkan jika cepat diterapi	Minimal (jempol)	Tidak ada	Sering tidak terdengar	Terdengar
Ilb	Sangat terancam, bisa diselamatkan jika revaskularisasi segera	Lebih dari jempol, nyeri saat istirahat	Ringan-sedang	Tidak terdengar	Terdengar
III	Ireversibel, sebagian besar jaringan mati, kerusakan saraf permanen	Mati rasa	Paralisis	Tidak terdengar	Tidak terdengar

Derajat kegawatdaruratan dan strategi pemilihan terapi pada penderita ALI sangat tergantung pada presentasi klinis, terutama adanya defisit neurologis. Bila ditemukan adanya defisit neurologis, maka harus dilakukan tindakan revaskularisasi segera, dimana pemeriksaan *imaging* tidak membuat penundaan intervensi. Pemeriksaan *imaging* yang relatif cepat dapat dilakukan pada kondisi ini antara lain *duplex ultrasound* (DUS) dan *digital subtraction ultrasound* (DSA) (Aboyans et al., 2017).

Berbagai modalitas revaskularisasi yang dapat dilakukan antara lain *percutaneous catheter-directed thrombolytic therapy*, *percutaneous mechanical thrombus extraction* atau thrombo-aspirasi (dengan atau tanpa terapi thrombolitik) dan pembedahan (thrombektomi,

*bypass* dan/atau *arterial repair*). Pemilihan strategi terapi tergantung pada ada tidaknya defisit neurologis, lamanya iskemik, lokasi, komorbid, tipe conduit (arteri atau *graft*), serta risiko dari tindakan itu sendiri (Aboyans et al., 2017). Tata laksana ALI dapat dilihat pada Gambar 13.



**Gambar 13.** Bagan tata laksana ALI (Aboyans et al., 2017)

Prognosis pasien setelah mengalami ALI adalah buruk. Terapi revaskularisasi turut memperburuk prognosis ALI, di samping kondisi pasien dengan atrial fibrilasi, penyakit arteri perifer, usia tua, dan tidak adekuatnya terapi statin. Komplikasi paska revaskularisasi yang sering terjadi antara lain *surgical graft thrombosis* dan *stent thrombosis* (Hess et al., 2019).

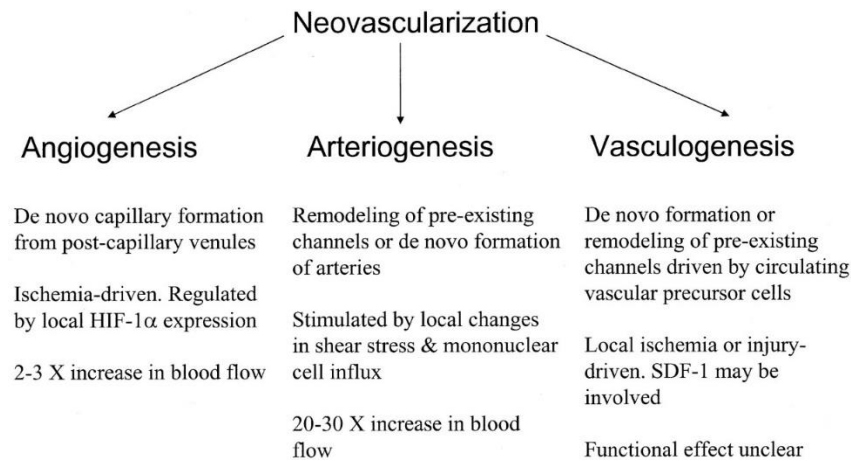
Berdasarkan permasalahan tersebut, maka dicarilah terapi alternatif yang dapat membantu mencegah kerusakan jaringan lebih lanjut maupun membantu proses penyembuhan pada pasien dengan penyakit pembuluh darah perifer, khususnya ALI. Salah satu terapi alternatif dan efektif dapat membantu penyembuhan penyakit pembuluh darah perifer sejak dahulu kala adalah CO<sub>2</sub>.



## C. NEOVASKULARISASI

### 2.14 Mekanisme Pembentukan Pembuluh Darah Baru/Neovaskularisasi

Neovaskularisasi merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru yang meliputi 3 proses, yaitu angiogenesis, arteriogenesis, dan vaskulogenesis (Simons M, 2005).



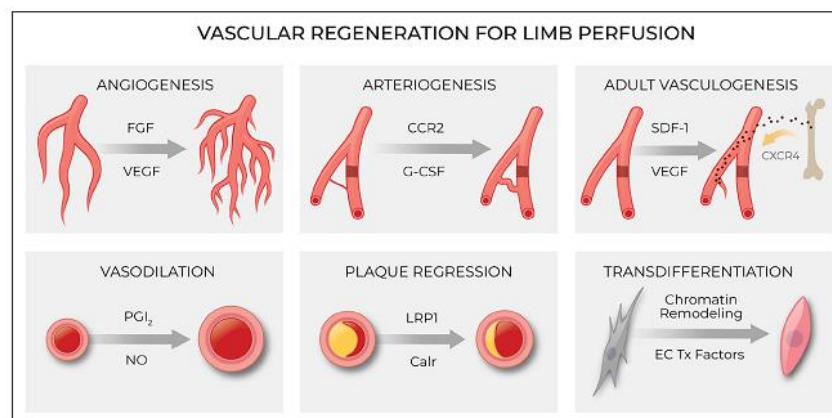
**Gambar 14.** Proses-proses yang terjadi pada neovaskularisasi (Simons M, 2005)

Angiogenesis merupakan pertumbuhan kapiler baru dari venula postkapiler yang terutama distimulasi oleh jaringan yang mengalami hipoksia melalui aktivasi *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  akan mentranskripsi berbagai gen, antara lain *vascular endothelial growth factor* (VEGF), reseptor VEGF flt-1 dan neuropilin-1, serta angiopoietin-2. Pada beberapa hewan coba, angiogenesis juga dapat membentuk pembuluh darah dengan ukuran yang lebih besar. Meskipun ukuran *capillary bed* yang terbentuk lebih besar, angiogenesis yang diinduksi oleh kondisi iskemik belum efektif meningkatkan aliran darah pada jaringan di bagian proksimal konduit arteri. (Simons, 2005).

Arteriogenesis mengacu pada proses pematangan atau pertumbuhan *de novo* dari kolateral dengan diameter yang cukup besar yang dapat divisualisasikan dengan pemeriksaan angiografi. Arteriogenesis biasanya terjadi di luar area iskemik sebagai respons terhadap perubahan lokal yang diinduksi oleh *shear stress* di lokasi terjadinya stenosis arteri. Pada proses ini kemudian akan dilepaskan sejumlah faktor pertumbuhan, antara lain *fibroblast*

*growth factors* (FGF), *platelet-derived growth factors* (PDGF), dan VEGF. Karena pada arteriogenesis terjadi pembentukan arteri yang cukup besar, maka kemampuannya untuk memperbaiki aliran darah dalam kondisi iskemik juga sangat besar. Hal yang penting dan hangat diperdebatkan terkait dengan arteriogenesis adalah apakah kolateral yang terbentuk terjadi secara *de novo* (mirip dengan angiogenesis) atau dari *remodeling* dan pembesaran vaskular yang telah ada sebelumnya. Studi angiografik pada tikus dengan model HLI menunjukkan bahwa arteriogenesis terjadi melalui proses remodeling dari pembuluh darah yang sudah ada sebelumnya. Namun, apakah proses serupa juga terjadi pada manusia? Hingga saat ini masih belum diketahui pasti. Dari pemeriksaan analisis yang lebih akurat dengan menggunakan CTA mikro didapatkan bahwa kolateral yang terbentuk cukup banyak, namun hanya sedikit yang mampu bertahan lama (Simons, 2005).

Vaskulogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah *in situ* dari *endothelial progenitor cells* (EPC) dan *vascular progenitor cells*. Manfaat signifikan dari proses vaskulogenesis dalam kondisi iskemik, baik pada sirkulasi koroner maupun perifer belum diketahui secara pasti sehingga masih diperlukan penelitian lebih lanjut (Simons, 2005).

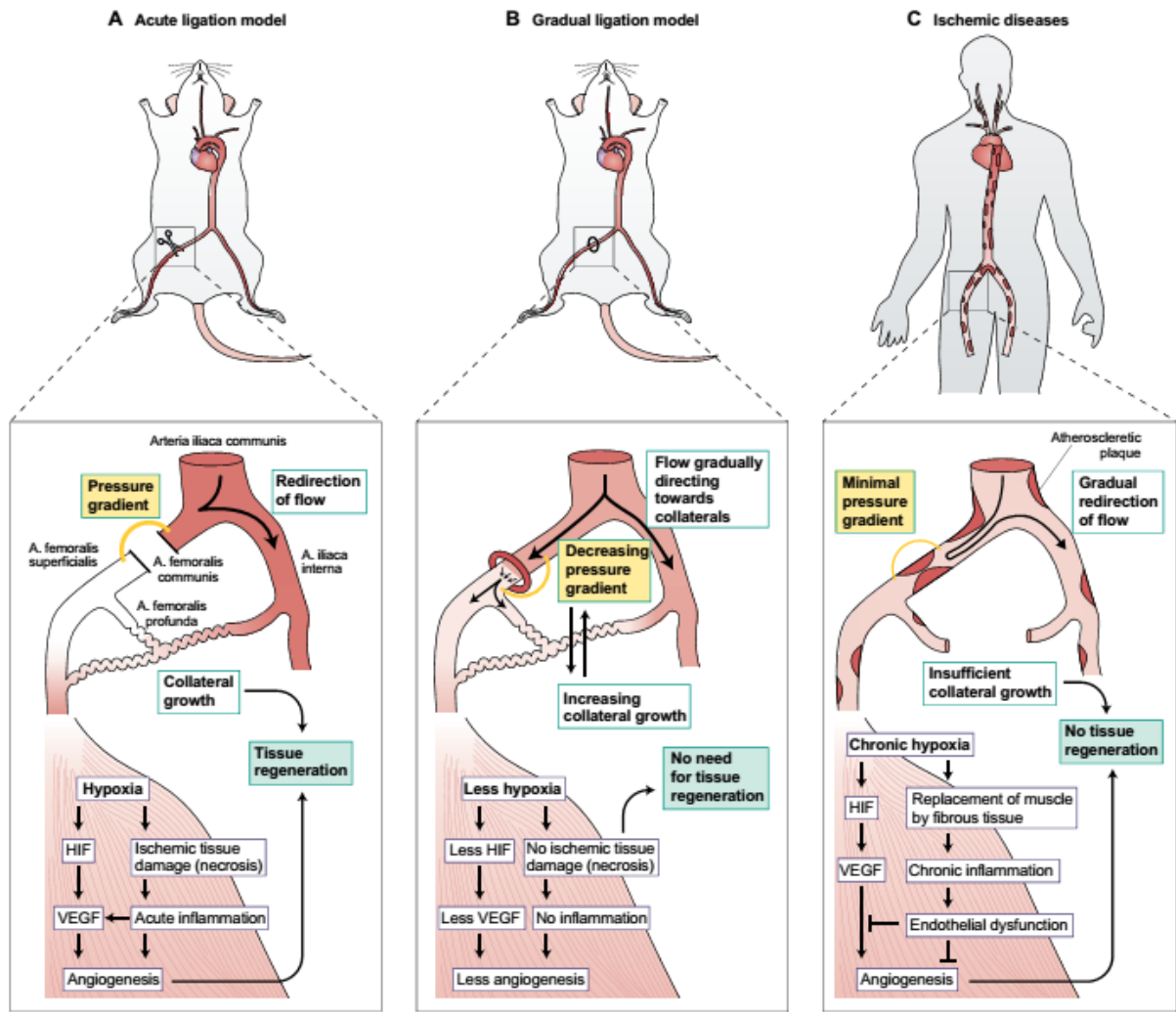


**CCR-2:** *CC-chemokine receptor-2*; **EC:** *endothelial cell*; **FGF:** *fibroblast growth factor*; **G-CSF:** *granulocyte-colony stimulating factor*; **LRP-1:** *low-density lipoprotein receptor-related protein-1*; **PGI<sub>2</sub>:** *prostacyclin*; **SDF-1:** *stromal-derived factor-1*; **Tx:** *transcriptional*; **VEGF:** *vascular endothelial growth factor*

**Gambar 15.** Perbedaan angiogenesis, arteriogenesis, vaskulogenesis

(Cooke dan Meng, 2020)

Pemilihan model yang akan diteliti perlu diperhatikan karena proses neovaskularisasi yang terjadi dapat berbeda.



**Gambar 16.** Perbandingan ligasi akut dengan kronis pada hewan coba dan penyakit iskemik pada manusia (Dragneva et al., 2013)

Pada kasus cedera jaringan, angiogenesis menjadi proses yang dominan dibandingkan dengan arteriogenesis. Pada kasus ligasi arteri femoralis, arteriogenesis terutama terjadi di lokasi ligasi, sedangkan angiogenesis lebih dominan terjadi di bagian distal dari iskemik. Pada tikus yang terkena radiasi dan mendapatkan transplantasi sumsum tulang, proses vaskulogenesis yang lebih dominan terjadi (Simons, 2005).

Setelah ligasi arteri total akut, terdapat perbedaan gradien tekanan yang tinggi antara bagian proksimal dan distal dari oklusi. Hal ini menyebabkan perubahan arah aliran darah

menuju arteriol-arteriol dengan *shear stress* yang tinggi sehingga merangsang terbentuknya kolateral yang akan memperlancar area yang mengalami hipoksia. Nekrosis terjadi bila dalam 1 jam paska oklusi, tidak terdapat aliran darah. Nekrosis akan menginduksi inflamasi akut, dimana akan dihasilkan sitokin-sitokin yang bersifat angiogenik, misalnya VEGF. Kondisi hipoksia juga akan mengaktifasi HIF yang akan menstimulasi produksi VEGF yang pada akhirnya akan terjadi angiogenesis. Bagian distal dari angiogenesis, bersamaan dengan terbentuknya kolateral, terbentuk pula hubungan antara kolateral dengan pembuluh darah kapiler bagian distal yang juga berkontribusi dalam penyembuhan jaringan (Gambar 16A).

Pada oklusi yang dibuat kronis, misalnya dengan menggunakan *ameroid constrictor*, oklusi yang berlangsung lambat akan merangsang pembentukan kolateral. Gradien tekanan tidak setinggi pada ligasi akut karena perubahan arah aliran darah terjadi secara bertahap. Tidak ditemukan kerusakan jaringan akut karena kolateral dapat mengkompensasi penurunan aliran darah sebelum aliran darah benar-benar terhenti. Hal ini mengakibatkan lebih sedikit inflamasi yang terjadi. Derajat hipoksia dan kerusakan jaringan bervariasi, tergantung dari banyaknya kolateral yang terbentuk dan berdampak pada respon angiogenik pada bagian distal oklusi. Bila kolateral yang terbentuk cukup, maka jaringan yang mengalami hipoksia tidak luas sehingga sedikit faktor pertumbuhan endogen yang dihasilkan dan kerusakan jaringan yang memerlukan perbaikan (Gambar 16B).

Pada manusia dengan penyakit iskemik, plak atherosklerosis terbentuk pada seluruh cabang pembuluh darah, menyebabkan tekanan darah menurun secara bertahap, sehingga oklusi tunggal di perifer menghasilkan gradien tekanan yang sangat rendah antara bagian proksimal dengan distal dari oklusi karena tekanan darah di atas oklusi sudah rendah. Keadaan ini menyebabkan berkurangnya aliran darah dan *shear stress* yang diperlukan untuk pembentukan kolateral sehingga kolateral yang terbentuk tidak memadai. Bagian distal dari oklusi secara bertahap berkembang menjadi hipoksia kronis yang bermanifestasi menjadi

inflamasi kronis dan penggantian serabut otot dengan jaringan fibrosis yang lebih sedikit menggunakan energi. Jaringan yang terbentuk akan menjadi kurang peka dalam merespon stimulus angiogenik karena adanya disfungsi endotel. Kolateral dan signal angiogenik yang tidak efektif ini akan mengganggu perbaikan jaringan, yang pada akhirnya akan menyebabkan nekrosis total dan hilangnya fungsi jaringan bila tidak segera diterapi (Gambar 16C) (Dragneva et al., 2013).

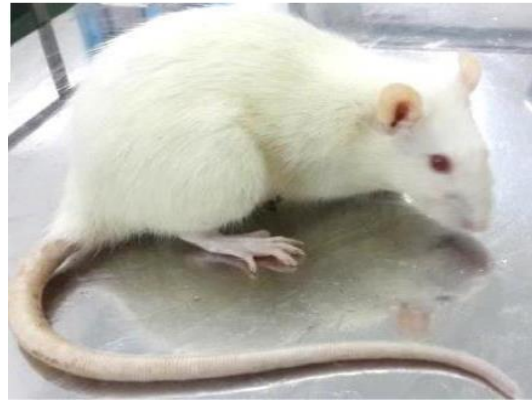
## **D. HEWAN COBA**

### **2.15 Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*)**

Hewan coba banyak digunakan dalam studi eksperimental berbagai cabang ilmu pengetahuan, termasuk di bidang medis, dengan pertimbangan penelitian tidak dapat diaplikasikan langsung pada manusia karena alasan praktis dan etis. Pemakaian hewan coba untuk penelitian klinis pada manusia telah memberikan kontribusi yang besar terhadap pemahaman berbagai proses fisiologis dan patologis yang terjadi pada manusia (Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2008).

Tikus merupakan hewan rodensia yang banyak digunakan dalam penelitian. Tikus sebagai “*mouse model*” sangat cocok digunakan untuk penelitian berbagai penyakit pada manusia karena adanya kesamaan struktur DNA dan ekspresi gen, dimana 98% gen manusia memiliki gen yang sebanding dengan gen tikus (Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2008). Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) atau yang dikenal sebagai *Norway rat* adalah salah satu hewan coba yang sering digunakan pada penelitian biomedis karena memiliki gen yang telah terkarakteristik dengan baik, galur yang bervariasi, serta tersedia dalam jumlah banyak. *Rattus norvegicus* yang digunakan pada penelitian ini merupakan jenis albino yang tidak memiliki pigmen melanin. Sifat tersebut diturunkan pada anak-anaknya (Barnett, 2002). Menurut Boolation dan Stikes (1991), taksonomi dari tikus Wistar adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia  
Divisi : Chordata  
Kelas : Mammalia  
Ordo : Rodentia  
Famili : Muridae  
Subfamili : Murinae  
Genus : Rattus  
Spesies : *Rattus norvegicus*



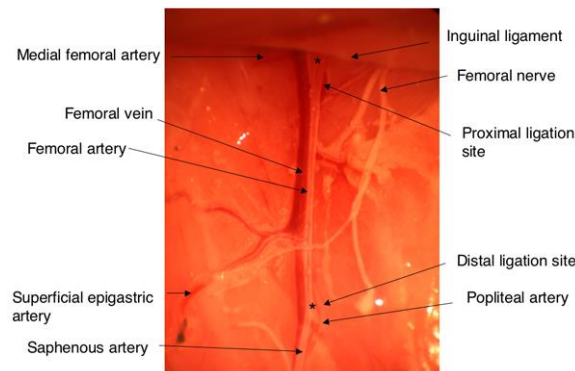
**Gambar 17.** Tikus Wistar jantan

Model hewan coba yang digunakan untuk penelitian pre-klinis sangat diperlukan untuk pengembangan terapi baru, penilaian intervensi medis, dan studi jalur molekuler yang terlibat dalam perkembangan penyakit. Variasi desain penelitian dan perlakuan pada hewan coba dapat meningkatkan keberhasilan aplikasi dari model hewan coba ke praktik klinis (Krishna et al., 2016).

Telah banyak penelitian yang dilakukan untuk memahami patofisiologi dan terapi alternatif pada penyakit pembuluh darah perifer, baik pada hewan coba maupun manusia. Akan tetapi, hingga saat karya tulis ini disusun, belum ada penelitian yang dilakukan pada kondisi ALI. Seperti telah disebutkan di atas, prognosis ALI adalah buruk, baik yang telah mendapatkan terapi (farmakologis dan/atau intervensi) maupun tidak diterapi, sehingga perlu dilakukan pendekatan terapeutik baru bagi pasien ALI untuk memperbaiki prognosis. Salah satu terapi alternatif yang sering digunakan dalam studi eksperimental baik pada hewan coba maupun manusia adalah CO<sub>2</sub>. Bila menggunakan subjek hewan coba, kondisi pembuluh darah perifer dibuat iskemik dengan meligasi arteri femoralis tikus, atau lazim disebut dengan istilah *hind limb ischaemic* (HLI). Metode HLI ini ternyata memiliki banyak versi, tidak ada keseragaman antara satu penelitian dengan penelitian yang lain.

## 2.16. Anatomi Pembuluh Darah Tungkai Tikus Wistar

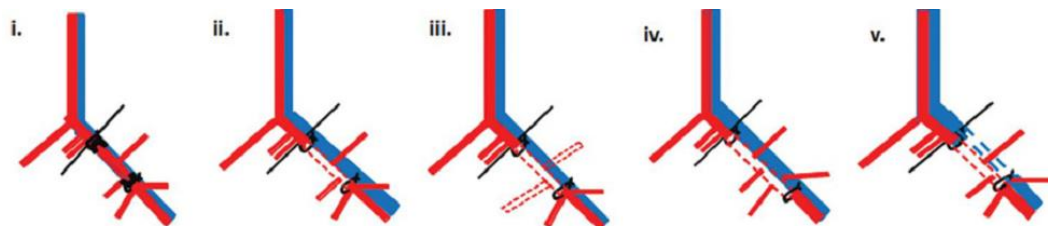
Sebelum menjelaskan berbagai metode HLI, terlebih dahulu perlu diketahui anatomi pembuluh darah tungkai tikus Wistar yang dapat dilihat pada Gambar 15 berikut ini:



**Gambar 18.** Anatomi pembuluh darah tungkai tikus Wistar (Niiyama et al., 2009)

## 2.17 Metode *Hind Limb Ischaemia* (HLI)

Dari berbagai kepustakaan dan studi-studi eksperimental dengan menggunakan metode HLI, tidak ditemukan adanya keseragaman dalam penerapannya. Berikut beberapa contoh metode *hind limb ischaemia* yang dapat dilakukan (Gambar 16):



**Gambar 19.** Berbagai metode *hind limb ischaemia* yang dapat dilakukan. (i) ligasi AF proksimal dan distal dengan benang *silk*, (ii) ligasi AF proksimal dan distal diikuti eksisi segmen di antaranya, (iii) ligasi dan eksisi seluruh AF dengan cabang-cabangnya, (iv) ligasi AF proksimal dan AS distal diikuti eksisi segmen di antaranya, (v) ligasi dan eksisi AF dan VF (AF = arteri femoralis, AS = arteri saphena, VF = vena femoralis) (Krishna et al., 2016)

Derajat iskemik yang dihasilkan oleh masing-masing metode HLI adalah tidak sama. Metode HLI pada (i) menghasilkan derajat iskemik paling rendah, sehingga cocok digunakan sebagai model gangguan pembuluh darah arteri perifer seperti pada *intermittent claudicatio* dan *chronic limb threatening ischaemia*. Derajat iskemik semakin meningkat dari (ii) hingga terjadi

auto-amputasi pada (v). Metode (ii) dianggap sebagai metode yang paling sesuai dengan kondisi ALI (oklusi arteri total yang terjadi akut), di mana bagian proksimal dan distal arteri femoral diikat mati, dan segmen di antaranya dieksisi untuk memastikan tidak ada aliran darah yang dapat lewat hingga ke distal (Krishna et al., 2016).

## 2.18 Parameter Penilaian Derajat Iskemik yang Diinduksi Metode HLI

Terdapat beberapa parameter yang dapat digunakan untuk menilai keberhasilan induksi iskemik dengan metode HLI, yaitu dengan menggunakan sistem skoring (*Functional Scoring*), darah (SGOT, LDH), dan pemeriksaan histopatologi (PA = Patologi Anatomi). Seluruh parameter tersebut juga dapat digunakan untuk *follow up* keberhasilan terapi.

### 2.18.1 *Functional Scoring*

Sistem skoring yang paling sering digunakan untuk menilai derajat nekrosis pada hewan coba setelah menjalani metode HLI adalah *Functional Scoring* yang meliputi Skor Tarlov untuk menilai fungsi motorik dan Skor Iskemik yang digunakan untuk menilai luas serta derajat iskemik (Brenes et al., 2012).

**Tabel 3.** *Functional Scoring* (Brenes et al., 2012)

Skor Tarlov	Deskripsi
0	Tidak ada pergerakan
1	Gerakan hampir tidak terlihat, berat badan tidak ditumpu pada tungkai yang terluka
2	Gerakan sedikit, berat badan tidak ditumpu pada tungkai yang terluka
3	Tungkai yang terluka dapat menopang sebagian berat badan
4	Mampu berjalan dengan defisit ringan
5	Normal namun lambat saat berjalan
6	Normal dan dapat berjalan cepat

Skor Iskemik	Deskripsi
0	Autoamputasi > setengah tungkai
1	Gangren > setengah tungkai
2	Gangren < setengah tungkai, terdapat nekrosis otot
3	Gangren < setengah tungkai tanpa ditemukan nekrosis otot
4	Tungkai pucat dan terdapat gangguan saat berjalan
5	Normal



### 2.18.2 Parameter Kerusakan Otot (SGOT dan LDH)

SGOT atau AST (*Aspartate Aminotransferase*) merupakan enzim transaminase yang terdapat pada seluruh jaringan tubuh, kecuali tulang, dimana kadar tertinggi ditemukan pada organ hepar dan otot skelet sehingga kadarnya akan meningkat bila terdapat kerusakan pada organ-organ tersebut (Washington dan Goosier, 2012). Waktu paruh SGOT pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) ± 47 jam dalam sirkulasi, 87 jam dalam mitokondria dengan nilai normal 4-688 IU/L (Charles River Laboratories, 2016). Tikus memiliki kadar SGOT yang tinggi, terutama bila mengalami nekrosis hepatoselular. Akan tetapi, kadar SGOT pada tikus dapat meningkat lebih dari 2 kali lipat tanpa ditemukannya lesi histologis, sehingga SGOT pada tikus dianggap sebagai indikator kerusakan jaringan yang sensitif namun kurang spesifik. Kadar SGOT ini tidak dipengaruhi oleh usia maupun jenis kelamin tikus. SGOT merupakan senyawa yang stabil, tidak berubah bila dibekukan, akan tetapi kadarnya dapat meningkat bila terjadi hemolisis karena enzim ini juga terdapat dalam eritrosit (Kusmeirczyk et al., 2020).

LDH merupakan enzim yang mengkatalisis perubahan piruvat menjadi laktat dalam proses glikolisis pada kondisi hipoksia/iskemik (Washington dan Goosier, 2012). LDH memiliki 5 isoenzim yang akan meningkat kadarnya bila terjadi kerusakan sel. Pada tikus, LDH paling banyak ditemukan dalam otot rangka dan otot jantung, diikuti oleh hepar, ginjal, dan usus. Kadar LDH lebih tinggi pada tikus jantan dan meningkat seiring pertambahan usia, baik pada tikus jantan maupun betina (Kusmeirczyk et al., 2020; Loeb dan Quimby, 1999). Kadar normal LDH pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) adalah 575-725 IU/L, dan mencapai kadar puncak dalam 48 jam *post injury* (Charles River Laboratories, 2016). Peningkatan kadar LDH akibat *injury* pada otot skelet dan otot jantung akan diikuti pula dengan kenaikan kadar *creatine kinase* (CK) dan SGOT. Kadar LDH akan meningkat bila terjadi hemolisis dan menurun bila sampel darah dibekukan (Kusmeirczyk et al., 2020; Loeb dan Quimby, 1999).

### 2.18.3 Pemeriksaan Histopatologi

Untuk membuktikan efek rendaman air CO<sub>2</sub> kadar tinggi pada pembuluh darah perifer, dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi CD31 yang merupakan marker sel endotel yang sensitif dan spesifik untuk memvisualisasikan pembuluh darah (Stuart LN, 2020) sehingga memungkinkan untuk dilakukan penghitungan jumlah vaskular/pembuluh darah tikus, dimana neovaskularisasi akan meningkatkan jumlah vaskular (Krishna et al., 2016). Antibodi CD31 telah dibuktikan oleh banyak penelitian sebagai marker superior untuk mengidentifikasi proses neovaskularisasi (Vanchinathan V et al., 2015).

Derajat nekrosis, edema jaringan, perdarahan, infiltrasi sel radang, dan struktur jaringan dapat dinilai dengan sistem skoring melalui pemeriksaan histologi rutin dengan menggunakan pewarnaan *hematoxylin* dan *eosin* (HE). Salah satu sistem skoring (kuantitatif) yang bisa digunakan dapat dilihat pada Tabel 4 di bawah ini. Skor 0 menandakan otot yang sehat, sedangkan skor 5 menandakan otot yang rusak (Bitto et al., 2008).

**Tabel 4.** Kriteria skoring pada pemeriksaan histologi (Bitto et al., 2008)

Skor	Nekrosis	Edema Jaringan	Perdarahan	Infiltrasi Sel Radang	Struktur Jaringan
0	Tidak ada kerusakan	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Terstruktur
1	Kerusakan lokal	Sedikit	Tidak ada	Ada	Sebagian besar terstruktur
2	Nekrosis lebih luas, melewati batas jaringan ikat, melibatkan sedikit fasikulus otot	Ada	Sedikit	Ada	Sebagian terstruktur
3	Nekrosis lebih luas, melewati batas jaringan ikat, melibatkan banyak fasikulus otot	Ada	Ada di antara serat otot	Ada	Sebagian kecil terstruktur
4	Kerusakan otot hampir memenuhi seluruh lapang pandang	Ada	Ada pada hampir seluruh lapang pandang	Ada	Tidak terstruktur
5	Kerusakan otot pada seluruh lapang pandang	Ada	Ada pada hampir seluruh lapang pandang	Ada	Tidak terstruktur