

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN MLC901 TERHADAP EKSPRESI mRNA GEN
VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF), KADAR
VEGF, KADAR NEURON SPECIFIC ENOLASE (NSE),
HISTOPATOLOGI DAN FUNGSI LOKOMOTOR PADA HEWAN COBA
CEDERA KORDA SPINALIS**

*Effect Of MLC901 On Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
mRNA Expression, VEGF Levels, Neuron-Specific Enolase (NSE)
Levels, Histopathology and Locomotor Functions In Experimental
Animals With Spinal Cord Injury*

WAHYUDI

C013172003



**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

DISERTASI

PENGARUH PEMBERIAN MLC901 TERHADAP EKSPRESI mRNA GEN VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF), KADAR VEGF, KADAR NEURON SPECIFIC ENOLASE (NSE), HISTOPATOLOGI DAN FUNGSI LOKOMOTOR PADA HEWAN COBA CEDERA KORDA SPINALIS

Effect Of MLC901 On Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA Expression, VEGF Levels, Neuron-Specific Enolase (NSE) Levels, Histopathology and Locomotor Functions In Experimental Animals With Spinal Cord Injury

Disusun dan diajukan
Oleh

Wahyudi
C013172003

Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal, 25 Februari 2022 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui
Promotor,

Prof.-Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS(K)- FICS
Nip. 19551019 198203 1 001

Co. Promotor

Co. Promotor

Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
Nip. 19570416 198503 1 001

Dr. dr. Wily Adhimarta, Sp.BS(K)
Nip. 19760322 200812 1 001

Ketua Program/Studi S3
Ilmu Kedokteran

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,

dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)
Nip. 19700821 199903 1 001

Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed
Nip. 19661213 199503 1 009

ABSTRAK

WAHYUDI. Pengaruh Pemberian MLC 901 terhadap Ekspresi mRNA Gen Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Kadar VEGF, Kadar Neuron Specific Enolase (NSE), Histopatologi, dan Fungsi Lokomotor pada Hewan Coba Cedera Korda Spinalis (dibimbing oleh Andi Asadul Islam, Mochammad Hatta, dan Willy Adhimarta).

Penelitian ini bertujuan mengetahui: (1) ekspresi mRNA gen vascular endothelial growth factor (mRNA VEGF) pada tikus *sprague dawley* sebelum mengalami cedera korda spinalis; (2) kadar vascular endothelial growth factor (VEGF) plasma pada tikus *sprague dawley* sebelum mengalami cedera korda spinalis; (3) kadar *neuron specific enolase* (NSE) plasma pada tikus *sprague dawley* sebelum mengalami cedera korda spinalis; dan (4), pengaruh pemberian MLC 901 terhadap ekspresi mRNA vascular endothelial growth factor (VEGF) pada cedera korda spinalis di tikus *sprague dawley*.

Penelitian dilaksanakan di laboratorium hewan bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar. Metode yang digunakan adalah studi eksperimental. Pengambilan sampel dilakukan secara acak pada 10 hewan coba yang terbagi menjadi 2 kelompok perlakuan. Data dianalisis menggunakan analisis statistik melalui uji komparatif, dilanjutkan dengan uji korelasi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara signifikan pemberian MLC 901 menurunkan kadar vascular endothelial growth factor (VEGF), mRNA vascular endothelial growth factor (VEGF), neuron Specific enolase, persentase kerusakan jaringan korda spinalis, dan meningkatkan fungsi lokomotor pada tikus dengan cedera korda spinalis. Terdapat hubungan yang kuat antara peningkatan ekspresi mRNA gen vascular endothelial growth factor (VEGF), kadar vascular endothelial growth factor (VEGF), kadar neuron specific enolase (NSE), gambaran histopatologi dan fungsi lokomotor.

Kata kunci. VEGF, NSE, korda spinalis, MLC 901, ekspresi mRNA



ABSTRACT

WAHYUDI. *Effect of MLC 901 on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA Expression, VEGF levels, Neuron-specific Enolase (NSE) Levels, Histopathology and Locomotor Function in Experimental Animals with Spinal Cord Injury (Supervised by Andi Asadul Islam, Mochammad Hatta, and Willy Adhimarta)*

This study aims to determine (1) the expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA in Sprague Dawley rats before spinal cord injury; (2) plasma Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) levels in Sprague Dawley rats before spinal cord injury; (3) plasma levels of Neuron Specific Enolase (NSE) in Sprague dawley rats before spinal cord injury; (4) the effect of giving MLC 901 on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA expression in spinal cord injury in Sprague Dawley rats.

This research was conducted at the Animal Laboratory of the Microbiology section of the Faculty of Medicine, Hasanuddin University, Makassar. The method used in this research was an experimental study. Sampling was carried out randomly on 10 experimental animals which were divided into 2 treatment groups. The data were analyzed using statistical analysis through a comparative test followed by a correlation test.

The results show MLC 901 significantly reduced levels of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA, Neuron Specific Enolase, percentage of spinal cord tissue damage, and improved locomotor function in rats with spinal cord injury. There is a strong relationship between increased mRNA expression of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gene, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) levels, Neuron Specific Enolase (NSE) levels, histopathological features and locomotor function.

Keywords: VEGF, NSE, spinal cord, MLC 901, mRNA Expression





KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp. (0411)586010, (0411)586297

EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : WAHYUDI
NIM : C013172003
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

**PENGARUH PEMBERIAN MLC901 TERHADAP EKSPRESI mRNA GEN VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF), KADAR VEGF, KADAR NEURON
SPECIFIC ENOLASE (NSE), HISTOPATOLOGI DAN FUNGSI LOKOMOTOR PADA
HEWAN COBA CEDERA KORDA SPINALIS**

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 18 Maret 2022

Yang menyatakan,



WAHYUDI

**PENGARUH PEMBERIAN MLC901 TERHADAP EKSPRESI mRNA GEN
VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF), KADAR
VEGF, KADAR NEURON SPECIFIC ENOLASE (NSE),
HISTOPATOLOGI DAN FUNGSI LOKOMOTOR PADA HEWAN COBA
CEDERA KORDA SPINALIS**

***EFFECT OF MLC901 ON VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH
FACTOR (VEGF) mRNA EXPRESSION, VEGF LEVELS, NEURON-
SPECIFIC ENOLASE (NSE) LEVELS, HISTOPATHOLOGY AND
LOCOMOTOR FUNCTIONS IN EXPERIMENTAL ANIMALS WITH
SPINAL CORD INJURY***

Disusun dan diajukan oleh

WAHYUDI

C013172003

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji pada tanggal 24 Februari 2022 di

Makassar

Menyetujui,

Tim Promotor

Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS(K)-FICS

Promotor

Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK (K) Dr. dr. Willy Adhimarta, Sp.BS (K)

Ko-Promotor

Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3Ilmu Kedokteran

dr. Agussalim Bukhari, M. Clin, Med, Ph.D, Sp.GK (K)

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini menyatakan bahwa, disertasi yang berjudul “PENGARUH PEMBERIAN MLC901 TERHADAP EKSPRESI mRNA GEN *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR* (VEGF), KADAR VEGF, KADAR *NEURON SPECIFIC ENOLASE* (NSE), HISTOPATOLOGI DAN FUNGSI LOKOMOTOR PADA HEWAN COBA CEDERA KORDA SPINALIS” adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing (Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS(K)-FICS sebagai Promotor, Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, SpMK (K) sebagai ko-promotor-1 dan Dr.dr. Willy Adhimarta, Sp.BS (K) sebagai ko-promotor-2). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka disertasi ini. Sebagian dari isi disertasi ini telah dipublikasikan di Jurnal *Annals of Medicine and Surgery* (<https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.103344>) sebagai artikel dengan judul “*The Role of MLC901 in Reducing VEGF As A Vascular Permeability Marker in Rats With Spinal Cord Injury*”. Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa disertasi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 24 Februari 2022

Wahyudi
NIM C013172003

DAFTAR TIM PENGUJI

Promotor : Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS(K)-FICS

Co-Pomotor : Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, SpMK(K)

Co-Pomotor : Dr.dr. Willy Adhimarta, Sp.BS(K)

Anggota :

1. Dr. dr. Muhammad Faris, Sp.BS(K)
2. dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K)
3. Dr.dr. Prihantono, Sp.B(K)Onk
4. Dr. dr. Nasrullah. Sp.BS(K)
5. dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA (K), Sp.S
6. dr. Joko Hendarto, Ph.D

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya bersyukur bahwa disertasi ini akhirnya dapat terselesaikan dengan baik. Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan disertasi ini dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS(K)-FICS sebagai Promotor, Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, SpMK(K) sebagai ko-promotor-1 dan Dr.dr. Willy Adhimarta, Sp.BS(K) sebagai ko-promotor-2.

Saya mengucapkan berlimpah terima kasih kepada mereka. Penghargaan yang tinggi juga saya sampaikan kepada dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K) yang telah mengizinkan kami untuk melaksanakan penelitian di laboratorium, dan kepada Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K) atas kesempatan untuk menggunakan fasilitas dan peralatan di Laboratorium Biomolekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Terima kasih juga saya sampaikan kepada dr. Joko Hendarto, Ph.D atas bantuan dalam pengujian statistik. Kepada FKIK Universitas Muhammadiyah Makassar, saya mengucapkan terima kasih atas bantuan Sumbangan Pembinaan Pendidikan (SPP) yang diberikan selama menempuh program pendidikan doktor. Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada pimpinan Universitas Hasanuddin dan Sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin yang telah memfasilitasi saya menempuh program doktor serta para dosen dan rekan-rekan dalam tim penelitian.

Akhirnya, kepada kedua orang tua tercinta saya mengucapkan limpah terima kasih dan sembah sujud atas doa, pengorbanan dan memotivasi mereka selama saya menempuh pendidikan. Penghargaan yang besar juga saya sampaikan kepada isteri tercinta dan seluruh keluarga atas motivasi dan dukungan yang tak ternilai.

Penulis,

WAHYUDI

ABSTRAK

WAHYUDI. **Pengaruh Pemberian MLC901 Terhadap Ekspresi mRNA Gen *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), Kadar VEGF, Kadar *Neuron Spesific Enolase* (NSE), Histopatologi Dan Fungsi Lokomotor Pada Hewan Coba Cedera Korda Spinalis** (dibimbing oleh Andi Asadul Islam, Mochammad Hatta, Willy Adhimarta).

Penelitian ini bertujuan mengetahui (1) ekspresi mRNA Gen *Vascular Endothelial Growth Factor* (mRNA VEGF) pada tikus *Sprague dawley* sebelum mengalami cedera korda spinalis, (2) kadar *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) plasma pada tikus *Sprague dawley* sebelum mengalami cedera korda spinalis, (3) kadar *Neuron Specific Enolase* (NSE) plasma pada tikus *Sprague dawley* sebelum mengalami cedera korda spinalis, (4), pengaruh pemberian MLC901 terhadap histopatologi dan fungsi lokomotor pada hewan coba cedera korda spinalis

Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara signifikan pemberian MLC901 menurunkan kadar *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), mRNA *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Neuron Specific Enolase*, persentase kerusakan jaringan korda spinalis, dan meningkatkan fungsi lokomotor pada tikus dengan cedera korda spinalis. Terdapat hubungan yang kuat antara peningkatan ekspresi mRNA gen *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), kadar *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), kadar *Neuron Spesific Enolase* (NSE), gambaran histopatologi dan fungsi Lokomotor.

Kata kunci: MLC901, Cedera Korda Spinalis, gen MRNA VEGV, VEGF, NSE, Fungsi Lokomotor

ABSTRACT

WAHYUDI. Effect Of MLC901 On Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA Expression, VEGF Levels, Neuron-Specific Enolase (NSE) Levels, Histopathology and Locomotor Functions In Experimental Animals With Spinal Cord Injury (Supervised by Andi Asadul Islam, Mochammad Hatta, and Willy Adhimarta)

This study aims to determine (1) the expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA in Sprague Dawley rats before spinal cord injury; (2) plasma Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) levels in Sprague Dawley rats before spinal cord injury; (3) plasma levels of Neuron Specific Enolase (NSE) in Sprague Dawley rats before spinal cord injury; (4) the effect of giving MLC 901 on histopathology and locomotor functions in experimental animals with spinal cord injury.

This research was conducted at the Animal Laboratory of the Microbiology section of the Faculty of Medicine, Hasanuddin University, Makassar. The method used in this research was an experimental study. Sampling was carried out randomly on 10 experimental animals which were divided into 2 treatment groups. The data were analyzed using statistical analysis through a comparative test followed by a correlation test.

The result show MLC 901 significantly reduced levels of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA, Neuron Specific Enolase, percentage of spinal cord tissue damage, and improved locomotor function in rats with spinal cord injury. There is a strong relationship between increased mRNA expression of the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gene, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) levels, Neuron Specific Enolase (NSE) levels, histopathological features and locomotor function.

Keyword: VEGF, NSE, Spinal Cord, MLC 901, mRNA Expression

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR SINGKATAN, ISTILAH, DAN LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN UMUM	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Tujuan umum	7
1.3.2 Tujuan khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	8
1.4.1 Manfaat akademis	8
1.4.2 Manfaat klinis	8
1.4.3 Manfaat Masyarakat Luas	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Cedera Korda Spinalis	9
2.1.1 Definisi Cedera Korda Spinalis	9
2.1.2 Klasifikasi Cedera Korda Spinalis	10
2.1.3 Patofisiologi Cedera Korda Spinalis	11
2.1.4 Cedera Korda Spinalis Primer	15
2.1.5 Cedera Korda Spinalis Sekunder	16
2.2 MLC901	33
2.2.1 Efek Neuroproteksi	33
2.2.2 Efek Neuroregenerasi	37
2.3 <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	40
2.3.1 Efek VEGF pada Sel Neuron	41
2.3.2 Regulasi VEGF	43
2.3.3 Perubahan Level VEGF dan Ekspresi Reseptor VEGF Setelah Cedera Korda Spinalis	45
2.4 <i>Neuron Specific Enolase</i>	45

2.5	Fungsi Lokomotor	47
2.6	Model Cedera Korda Spinalis pada Hewan Coba (Tikus <i>Sprague-Dawley</i>).....	49
2.6.1	Anatomi Korda Spinalis Tikus.....	50
2.6.2	Cedera Korda Spinalis.....	51
2.6.3	<i>Clip Compression</i>	52
2.6.4	Gambaran Histopatologis Berdasarkan Derajat <i>Clip Compression</i>	54
BAB 3 KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, VARIABEL PENELITIAN DAN HIPOTESIS PENELITIAN		
3.1	Kerangka Teori	56
3.2	Kerangka Konseptual.....	58
3.3	Variabel Penelitian	59
3.4	Hipotesis Penelitian.....	59
BAB 4 METODE PENELITIAN		
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian.....	60
4.2	Unit Eksperimental, Replikasi dan Randomisasi	61
4.2.1	Unit Eksperimental	61
4.2.2	Replikasi Sampel.....	61
4.2.3	Randomisasi	61
4.3	Definisi Operasional Variabel.....	61
4.4	Cara Kerja dan Alur Penelitian	64
4.4.1	Kelompok Penelitian.....	64
4.4.2	Alur Penelitian	65
4.4.3	Keterangan Alur Penelitian.....	66
4.5	Metode Pemeriksaan dan Pewarnaan	68
4.5.1	Teknik Pemrosesan Jaringan dengan Metode Paraffin ..	68
4.5.2	Prosedur Pewarnaan	69
4.6	Pemeriksaan Kadar NSE Serum Menggunakan ELISA	70
4.7	Prosedur Pemeriksaan Ekspresi Gen Reseptor VEGF	71
4.7.1	Ekstraksi <i>Nucleic Acid</i>	71
4.7.2	Cara Kerja Realtime PCR untuk Menentukan Profil Ekspresi mRNA Gen target	72
4.8	Lokasi Penelitian	73
4.9	Etika Penelitian	73
4.10	Jenis dan Cara Pengumpulan Data	73
4.11	Rancangan Kegiatan.....	74
4.12	Analisis Data	74
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN		
5.1	Hasil Penelitian	76
5.1.1	Karakteristik Subyek Penelitian.....	76

5.1.2	Efek Pemberian MLC 901 terhadap Ekspresi mRNA VEGF pada Hewan Coba Tikus dengan Cedera Korda Spinalis	77
5.1.3	Efek Pemberian MLC 901 terhadap Kadar VEGF pada Hewan Coba Tikus dengan Cedera Korda Spinalis	78
5.1.4	Efek Pemberian MLC 901 terhadap Kadar NSE pada Hewan Coba Tikus dengan Cedera Korda Spinalis	80
5.1.5	Efek Pemberian MLC 901 terhadap Gambaran Histopatologi pada Hewan Coba Tikus Dengan Cedera Korda Spinalis.....	83
5.1.6	Efek Pemberian MLC 901 Terhadap Fungsi Lokomotor pada Hewan Coba Tikus dengan Cedera Korda Spinalis	85
5.2	Pembahasan Penelitian	87
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN		
6.1	Kesimpulan	91
6.2	Saran	91
DAFTAR PUSTAKA.....		92
LAMPIRAN.....		98

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Fase Setelah Cedera Korda Spinalis	13
Tabel 4.1 Jenis dan Cara Pengumpulan Data.....	73
Tabel 4.2 Rancangan Kegiatan.....	74
Tabel 5.1 Data Berat Badan Tikus <i>Sprague Dawley</i>	76
Tabel 5.2 Efek LMC901 terhadap Ekspresi mRNA Gen VGEF pada Hewan Coba Tikus dengan Cedera Korda Spinalis	77
Tabel 5.3 Efek MLC901 terhadap Kadar VGEF pada Hewan Coba Tikus dengan Cedera Korda Spinalis	79
Tabel 5.4 Efek MLC901 terhadap Kadar NSE pada Hewan Coba Tikus dengan Cedera Korda Spinalis	81
Tabel 5.5 Efek MLC901 terhadap Perubahan Gambran Histopatologis pada Hewan Coba Tikus dengan Cedera Korda Spinalis ..	83
Tabel 5.6 Efek MLC901 Terhadap Fungsi Lokomotor pada Hewan Coba Tikus dengan Cedera Korda Spinalis	85

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Diagram Klasifikasi ASIA.....	11
Gambar 2.2 Kerusakan Setelah Cedera Korda Spinalis	15
Gambar 2.3 Perbedaan Nekrosis dan Apoptosis	17
Gambar 2.4 Jalur Intrinsik dan Ekstrinsik Apoptosis	19
Gambar 2.5 Skema Pembentukan Dari ROS.....	23
Gambar 2.6 Stres Oksidatif Pada Cedera Korda Spinalis	24
Gambar 2.7 Detoksifikasi ROS Oleh Antioksidan Seluler	26
Gambar 2.8 Reaksi Berantai Peroksidasi Lipid yang Disebabkan Radikal Bebas.....	27
Gambar 2.9 Mekanisme Eksitotoksitas	27
Gambar 2.10 Mekanisme Eksitotoksitas dan Apoptosis pada Oligodendrosit.....	28
Gambar 2.11 Efek Neuroproteksi MLC901	37
Gambar 2.12 Efek Neuroproteksi MLC901	39
Gambar 2.13 Efek Pleiotropic dari VEGF.....	43
Gambar 2.14 HIF-1 α Pada Keadaan Normoksia dan Hipoksia	44
Gambar 2.15 Tabel Penilaian Skor BBB	48
Gambar 2.16 Klip Aneurisma yang Telah Dimodifikasi Digunakan Untuk Membuat Cedera pada Korda Spinalis	53
Gambar 2.17 Gambaran Representatif Korda Spinalis Setelah <i>Clip Compression</i>	55
Gambar 3.1 Kerangka Teori Penelitian	56
Gambar 3.2 Kerangka Konsep Penelitian	58
Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian	60
Gambar 4.2 Gambaran Kerangka <i>Sprague Dawley</i>	62
Gambar 4.3 Tabel Penilaian Skor BBB	64
Gambar 4.4 Alur Penelitian	65
Gambar 4.5 <i>Yasargil Clip</i> yang Sudah Dimodifikasi	67
Gambar 5.1 Ekspresi mRNA VGEF Pada Hewan Coba Tikus dengan dan Tanpa Pemberian MLC901	78
Gambar 5.2 Kadar VGEF pada Hewan Coba Tikus dengan dan tanpa Pemberian MLC901	80
Gambar 5.3 Kadar NSE pada Hewan Coba Tikus dengan dan tanpa Pemberian MLC901	82
Gambar 5.4 Gambaran Histopatologis Jaringan Korda Spinalis Tikus <i>Sprague Dawley</i> Model Cedera Korda Spinalis	84

DAFTAR SINGKATAN, ISTILAH, DAN LAMBANG

ALS	: <i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i>
AMPA	: α -amino-3 hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionate
APAF-1	: <i>Apoptic peptidase activating factor-1</i>
ASIA	: <i>American Spinal Injury Association</i>
BBB	: <i>Blood Brain Barrier</i>
BBB Score	: <i>Basso Beattie Bresnahan Score</i>
BSCB	: <i>Blood Spinal Cord Barrier</i>
CKS	: <i>Cedera Korda Spinalis</i>
CSPGs	: <i>Chondroitin Sulfate Proteoglycans</i>
DIABLO	: <i>Direct Inhibitor of Apoptosis Binding Protein</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EAE	: <i>Experimental Autoimmune Encephalomyelitis</i>
FADD	: <i>Fas-Associated Protein With Death Domain</i>
HRE	: <i>Hypoxia – Response Element</i>
HIF	: <i>Hypoxia - Induce Transcription Factors</i>
IAPs	: <i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>
IRI	: <i>Ischemic -Reperfusion injury</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
MPSS	: <i>Methylprednisolone Sodium Succinate</i>
MRI	: <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
mRNA	: <i>Messenger RNA</i>
NMDA	: <i>N-metil-d-aspartate</i>

NSE	: <i>Neuro Specific Enolase</i>
Oc	: Occipital
O ₂	: Oksigen
ROS	: <i>Reactive Oxydative Stress</i>
RE	: Reetikulum Endoplasma
SCI	: <i>Spinal Cord Injury</i>
Smac	: <i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SOD	: Superoksida
SSP	: Sistem Saraf Pusat
TNF	: Tumor Necrosis Factor
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VPF	: <i>Vascular Permeability Factor</i>

BAB 1

PENDAHULUAN UMUM

1.1 Latar Belakang

Cedera korda spinalis adalah terjadinya lesi traumatis dari elemen-elemen saraf di kanalis spinalis yaitu korda spinalis dan cauda equina, sehingga terjadi defisit motorik dan atau sensoris sementara atau permanen (Paterniti et al., 2016). Setiap tahun terjadi kerugian lebih dari 7 miliar dolar yang disebabkan oleh cedera korda spinalis (Hawryluk et al., 2017). Cedera korda spinalis dianggap sebagai kondisi yang tidak dapat disembuhkan meskipun terdapat kemajuan besar di bidang medis dan memiliki dampak buruk yang besar pada fisik dan psikososial pasien dan tenaga medis (Rodrigues et al., 2018).

Insiden cedera korda spinalis di dunia adalah 15 sampai 40 kasus per juta penduduk, di Amerika Utara terjadi sekitar 15.000 kasus baru per tahun (Hawryluk et al., 2017). Di Asia, insiden cedera korda spinalis berkisar antara 12.6 sampai 61.6 per juta penduduk. Insiden tertinggi terjadi di Taiwan dengan 61.6 per juta penduduk berkisar lebih lima kali lipat dari insiden terendah di Anatolia, Turki. Usia rata-rata berkisar antara 26,8 hingga 56,6 tahun. Pria berisiko lebih tinggi daripada wanita. Namun, persentase cedera baru pada wanita sedikit meningkat. Di Taiwan, rasio gender adalah 4,9:1 selama 1978–1981 dan 2,75:1 pada 2002–2003. Tren serupa ditemukan di Thailand, dimana tingkat kejadian 11,1 kali lebih tinggi pada pria antara 1985 dan 1991, tetapi hanya 5,6 kali lebih tinggi selama 1989-1994. Tabrakan kendaraan bermotor dan jatuh adalah penyebab utama. Luka perang melampaui tabrakan kendaraan bermotor dan jatuh sebagai penyebab utama cedera dalam sebuah penelitian di Afghanistan (Ning et al., 2012).

Dibutuhkan dana perawatan yang signifikan bagi pasien dan keluarga untuk penanganan cedera korda spinalis. Di Kanada dibutuhkan 3 juta dollar untuk biaya perawatan kasus cedera korda spinalis yang menyebabkan kelumpuhan. Beban ekonomi sebesar 2,5 juta dolar per tahunnya ditimbulkan oleh kasus cedera korda spinalis baik secara langsung maupun tidak langsung (Krueger et al., 2013).

Cedera korda spinalis biasanya terjadi pada segmen yang paling banyak bergerak seperti pada segmen *cervical* dan *thoracolumbal*. Pada segmen *cervical* 25% dari semua cedera terjadi pada bagian *upper cervical spine* ($O_c - C_2$) sisanya sebesar 75% terjadi di daerah *subaxial* (C_3-C_7). Cedera multipel diperkirakan terjadi pada 4% hingga 20% dari semua kasus. Pada segmen *thoracolumbal* distribusi cedera anatomis paling sering terjadi pada *thoracolumbar junction* dengan L_1 terhitung 16% dari semua cedera (Malhotra et al., 2010). Bentuk paling umum dari cedera primer adalah *impact* dengan *persistent compression*, yang biasanya terjadi pada fraktur tipe *burst* dengan fragmen tulang menekan korda spinalis atau melalui cedera fraktur-dislokasi (Alizadeh et al., 2019).

Harvey Cushing yang merupakan ahli bedah saraf terkenal menuliskan lebih dari 80% tentara yang mengalami cedera korda spinalis pada Perang Dunia I meninggal dalam beberapa minggu pertama. Jenderal George Patton (1885 – 1945) merupakan seorang jenderal Angkatan Darat Amerika Serikat ketika Perang Dunia II berkecamuk, mengalami kecelakaan kendaraan bermotor. Dia menderita cedera korda spinalis *cervical*, mengetahui bahwa cedera korda spinalis tidak dapat disembuhkan. Dia kemudian menolak semua tindakan pengobatan dan dilaporkan meninggal akibat komplikasi kardiovaskular (Donovan, 2007).

Pada pertengahan abad ke 20 terjadi kemajuan signifikan pada bidang pembedahan tulang belakang. Tindakan dekompresi bagian tulang belakang yang menekan korda spinalis dan pemakaian fiksasi internal, memberikan dampak positif pada pengurangan cedera sekunder dan segera tercipta stabilitas tulang belakang, sehingga memungkinkan mobilisasi lebih cepat dan waktu rawat inap yang lebih singkat. Namun, perbaikan fungsi korda spinalis setelah trauma masih merupakan tantangan yang sangat besar (Silber et al., 2007).

Hingga saat ini penanganan pada kasus cedera korda spinalis masih menjadi perdebatan, termasuk penggunaan kortikosteroid seperti *methylprednisolone sodium succinate* (MPSS), waktu optimal intervensi bedah, jenis dan waktu profilaksis antikoagulasi, peran *magnetic resonance imaging* (MRI), dan jenis serta waktu rehabilitasi (Fehlings et al., 2017).

Pada fase cedera korda spinalis, terjadi berbagai perubahan patofisiologis seperti edema vasogenik, vasospasme pembuluh darah mikro, trombosis, ketidakseimbangan ion, kehilangan gradien natrium, pelepasan opioid

neurotoksik, inflamasi, peroksidasi lipid, eksitasi glutaminergik, edema sitotoksik, dan pembentukan radikal bebas (Wilson & Fehlings, 2011). Strategi terapi dengan target yang spesifik berdasarkan pemahaman lebih lanjut tentang inflamasi pascatrauma dan bagaimana pengaruhnya terhadap cedera sekunder. Secara khusus, *ischemic – reperfusion injury* (IRI) merupakan komponen penting pada cedera korda spinalis yang mengakibatkan disfungsi endotelial dan perubahan pada permeabilitas vaskuler, hal ini memicu kaskade inflamasi secara keseluruhan yang berasal dari aktivasi sel-sel imun *innate* (mikroglia dan astrosit) dan menginfiltrasi leukosit (neutrofil dan makrofag) (Anwar et al., 2016).

Pada kasus cedera korda spinalis, *impact* dengan *persistent compression*, *impact* dengan *transient compression*, distraksi dan laserasi merupakan mekanisme yang dapat terjadi (Rowland et al., 2008). Melalui mekanisme tersebut, gaya yang ditimbulkan pada saat trauma primer dapat menimbulkan kerusakan sekunder atau lebih lanjut pada korda spinalis. Hal tersebut membutuhkan penatalaksanaan yang tepat dengan tujuan mencegah terjadinya kerusakan sekunder atau lebih lanjut. *Early decompression* dan manajemen pencegahan kerusakan sekunder merupakan terapi ideal untuk mencegah kerusakan lebih lanjut pada kasus trauma kompresi berat (Alizadeh et al., 2019).

Menurut Kelompok Studi Trauma Tulang Belakang 24 jam pertama merupakan waktu terbaik untuk dilakukan tindakan dekompresi sehingga memberi efek protektif terhadap saraf (Fehlings et al., 2012). Namun hingga saat ini, belum ada pedoman bedah yang secara ketat mengeksplorasi manfaat dari tindakan bedah yang dilakukan pada fase awal atau lanjut pada cedera korda spinalis. Pedoman sebelumnya mengenai waktu tindakan bedah menunjukkan terdapat bukti kelas II yang mendukung bahwa operasi awal < 72 jam dapat dilakukan dengan aman pada pasien dengan cedera korda spinalis jika mereka memiliki hemodinamik yang stabil. Pada pasien dengan tetraplegia inkomplit direkomendasikan untuk dilakukan tindakan dekompresi segera, dan rekomendasi untuk dekompresi yang urgent pada pasien dengan cedera korda spinalis dengan kerusakan neurologis (Fehlings & Perrin, 2006).

MLC901/MLC601 (NeuroAiD) kombinasi dari produk alami telah terbukti aman dan membantu pemulihan neurologis setelah cedera otak dan mungkin memiliki peran potensial dalam meningkatkan pemulihan setelah cedera korda spinalis (Kumar et al., 2016).

Di bidang stroke, MLC601 dan MLC901 muncul sebagai pengobatan yang menjanjikan untuk meningkatkan pemulihan fungsional pasien setelah stroke iskemik. Pada penelitian di Filipina yang mencakup banyak pasien dengan prognosis buruk, Neuroaid meningkatkan pemulihan fungsional mereka. Studi terbaru mengungkapkan bahwa perawatan 3 bulan dengan neuroaid meningkatkan hasil fungsional hingga 2 tahun diantara pasien dengan stroke keparahan sedang (Widmann et al., 2018). Neuroaid terbukti menginduksi neuroplastisitas, mempromosikan proliferasi sel dan menstimulasi perkembangan dari axon dan dendrit (Chen et al., 2013).

Selain itu, MLC 901 juga menurunkan lesi otak yang disebabkan oleh cedera otak traumatik. MLC 901 mengurangi volume infark ketika disuntikkan hingga 2 jam setelah cedera otak traumatik. Selain itu MLC 901 juga mencegah pembentukan edema dan membantu terjadinya resolusi, yang mungkin di regulasi melalui aquaporin 4. MLC 901 mencegah peningkatan serum *Neuron Specific Enolase* (NSE), yang merupakan marker untuk memprediksi hasil neurologis pada pasien dengan cedera otak. Sebagai tambahan, MLC 901 juga memiliki efek positif dengan meningkatkan regulasi VEGF pada kelompok tikus dengan cedera otak traumatik yang diberikan MLC 901 bila dibandingkan dengan kelompok vehicle dan juga meningkatkan neurogenesis hipokampus endogen dan gliogenesis di sekitar lesi (Quintard et al., 2014).

Neuroaid (MLC601) berasal dari pengobatan tradisional dan mengandung 9 herbal dan 5 komponen hewani. Ini tersedia secara luas di Cina dan di banyak negara di Asia. Di eropa, formula yang disederhanakan (MLC901) yang hanya terdiri dari 9 jenis herbal tersedia. MLC901 telah menunjukkan efektifitas yang sama terhadap MLC601 pada penelitian preklinis selular dan stroke pada model hewan (Chen et al., 2013). Formula yang telah disederhanakan (MLC901) dipilih untuk investigasi lebih lanjut pada penelitian ini.

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), awalnya ditemukan pada tahun 1983 sebagai *Vascular Permeability Factor* (VPF) dan berhasil di kloning pada tahun 1989. VEGF merupakan faktor penting untuk angiogenesis. Selama dekade terakhir, telah banyak penelitian yang diterbitkan tentang aktivitas angiogenik dari VEGF. Bukti terbaru menunjukkan VEGF juga memiliki efek langsung pada berbagai sel saraf termasuk neuron, Schwann sel, astrosit, neural stem sel dan microglia (Storkebaum et al., 2004).

Pada kultur *dorsal root ganglia*, VEGF merangsang pertumbuhan aksonal dan meningkatkan kelangsungan hidup neuron dan sel satelit. Pada jaringan mesensefalon VEGF meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup dopaminergik dan astrosit. Selain itu VEGF juga melindungi sel neuron hippocampus dari peningkatan toksik glutamat dan cedera hipoksia. Sehingga VEGF memiliki efek neutropik in vitro langsung pada berbagai jenis sel saraf (Storkebaum et al., 2004).

Hipoksia seperti yang dialami pada cedera korda spinalis merupakan stimulus penting pada ekspresi VEGF. Peningkatan level protein VEGF dibawah kondisi hipoksia disebabkan oleh pengendalian pada tingkat transkripsi dan translasi. *Hypoxia – inducible transcription factors* (HIF) mengikat *hypoxia – response element* (HRE) dalam promotor VEGF dan dengan demikian mengatur transkripsi VEGF pada hipoksia (Storkebaum et al., 2004).

Selain peran kanoniknya dalam sistem kardiovaskular, VEGF juga telah terbukti meningkatkan perlindungan saraf, panduan aksonal, kelangsungan hidup dan migrasi sel Schwann, dan proliferasi astrosit, mikroglia, dan sel induk saraf. VEGF memiliki potensi terapeutik yang tinggi terutama untuk cedera korda spinalis, untuk mempromosikan revaskularisasi korda spinalis, neuroproteksi, proliferasi sel, dan regenerasi jaringan, pada akhirnya untuk meningkatkan pemulihan fungsional. Pada penelitian mengenai cedera korda spinalis, VEGF menunjukkan berbagai peran seperti pada promosi angiogenesis, mengurangi *glial scar*, mempromosikan neuritogenesis ke dalam lesi, mempromosikan oligodendrogenesis dan meningkatkan integritas mielin, mengurangi volume lesi jaringan dan meningkatkan fungsi lokomotor. Oleh karena itu, VEGF tampaknya dapat menjadi pemilihan terapi yang menjanjikan untuk perbaikan cedera pada sistem saraf, karena trauma dan penyakit degeneratif (Walker & Xu, 2018).

Neuron Specific Enolase (NSE) adalah enzim glikolitik yang ditemukan di jaringan neuron dan neuroendokrin. Peningkatan NSE dapat meningkatkan degradasi matriks ekstraselular, proliferasi sel glial inflamasi, dan remodel aktin, sehingga mempengaruhi migrasi makrofag dan mikroglia ke lokasi cedera dan menyebabkan kematian sel. Dengan demikian, NSE bisa menjadi penanda cedera saraf yang andal, kuantitatif, dan spesifik (Haque et al., 2018).

Kerusakan neuron setelah cedera korda spinalis dikaitkan dengan peningkatan NSE yang juga diketahui berperan dalam patogenesis cedera otak hipoksi – iskemik. Dengan demikian, NSE sekarang dianggap sebagai biomarker

pada kerusakan otak iskemik dan baru-baru ini juga disarankan menjadi biomarker pada cedera otak traumatik, stroke, ensefalopati anoksi setelah serangan jantung dan juga cedera korda spinalis (Haque et al., 2016).

Penelitian terbaru menemukan tingkat ekspresi NSE di jaringan meningkat setelah terjadi cedera korda spinalis akut dan penghambatan ekspresi dan aktifitas NSE menurunkan cedera sekunder pada cedera korda spinalis. Selain itu, penghambatan NSE telah terbukti mengurangi sitokin inflamasi, dan mengurangi gliosis setelah cedera korda spinalis melalui jalur seluler dan metabolik yang berbeda (Haque et al., 2018).

Belum adanya penelitian MLC901 pada cedera korda spinalis terutama yang membahas patomekanisme tingkat biomolekuler, sudah terbuktinya manfaat MLC901 pada cedera otak, adanya potensi VEGF sebagai neuroprotektor dan dijadikannya kadar NSE sebagai marker cedera korda spinalis, menjadi perhatian penulis untuk melakukan penelitian dengan judul **Pengaruh Pemberian MLC901 Terhadap Ekspresi mRNA Gen *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), Kadar VEGF, Kadar *Neuron Specific Enolase* (NSE), Histopatologi Dan Fungsi Lokomotor Pada Animal Model Cedera Korda Spinalis.**

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, maka masalah penelitian dapat dirumuskan sebagai berikut :

- a. Apakah peran MLC901 pada perubahan ekspresi mRNA gen VEGF pada serum hewan coba yang mengalami cedera korda spinalis?
- b. Apakah peran MLC901 pada perubahan kadar VEGF pada serum hewan coba yang mengalami cedera korda spinalis?
- c. Apakah peran MLC901 pada perubahan kadar NSE pada serum hewan coba yang mengalami cedera korda spinalis?
- d. Apakah peran MLC901 pada perubahan gambaran histopatologis korda spinalis pada hewan coba yang mengalami cedera korda spinalis?
- e. Apakah peran MLC901 pada perubahan fungsi lokomotor pada hewan coba yang mengalami cedera korda spinalis?

- f. Bagaimana hubungan antara mRNA gen VEGF, kadar VEGF dan kadar NSE dengan gambaran histopatologis dan fungsi lokomotor pada hewan coba yang diberi MLC 901?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui peran MLC901 pada perbaikan fungsi lokomotor dan gambaran histopatologis korda spinalis melalui ekspresi mRNA Gen VEGF, kadar VEGF dan kadar NSE serum, pada hewan coba setelah cedera korda spinalis.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Diketuainya peran MLC901 pada perubahan ekspresi mRNA gen VEGF pada serum hewan coba yang mengalami cedera korda spinalis.
- b. Diketuainya peran MLC901 pada perubahan kadar VEGF pada serum hewan coba yang mengalami cedera korda spinalis.
- c. Diketuainya peran MLC901 pada perubahan kadar NSE pada serum hewan coba yang mengalami cedera korda spinalis.
- d. Diketuainya peran MLC901 pada perubahan gambaran histopatologis korda spinalis pada hewan coba yang mengalami cedera korda spinalis.
- e. Diketuainya peran MLC901 pada perubahan fungsi lokomotor pada hewan coba yang mengalami cedera korda spinalis.
- f. Diketuainya hubungan antara mRNA gen VEGF, kadar VEGF dan kadar NSE dengan gambaran histopatologis dan fungsi lokomotor pada hewan coba yang diberi MLC 901.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

1. Memberikan sumbangan bagi pengembangan ilmu pengetahuan bedah saraf dari sudut ilmu dasar dan klinis.
2. Menambah pemahaman tentang peranan intervensi MLC901 terhadap gambaran histopatologis dan fungsi lokomotor pada pasien cedera korda spinalis.

1.4.2 Manfaat Klinis

1. Dapat digunakan sebagai modalitas terapi medikamentosa pasien cedera korda spinalis.
2. Dapat memperbaiki fungsi korda spinalis yang telah mengalami cedera.

1.4.3 Manfaat Masyarakat Luas

Membantu mempercepat proses pemulihan pasca cedera korda spinalis, sehingga dapat mengurangi biaya perawatan pasien cedera korda spinal.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Cedera Korda Spinalis

2.1.1 Definisi Cedera Korda Spinalis

Korda spinalis tersusun dari jalur kompleks yang menyampaikan informasi dan instruksi antara otak dan bagian tubuh lainnya. Beberapa jalur anatomi yang berbeda di dalam korda spinalis bertanggung jawab untuk transmisi informasi spesifik. Traktus kortikospinalis bertanggung jawab untuk transmisi informasi yang berkaitan dengan fungsi motorik, sedangkan traktus spinotalamikus dan columna posterior adalah jalur sensorik utama. Jalur sensorik ini memiliki jalur yang berbeda tergantung dari sensasi yang disampaikan. Columna posterior menyampaikan informasi untuk getaran, sentuhan halus, dan propriosepsi sedangkan traktus spinotalamikus menyampaikan sensasi nyeri, suhu, dan sentuhan kasar. Korda spinalis memanjang ke distal sebagai kelanjutan dari medulla oblongata, meruncing membentuk conus medullaris biasanya pada tingkat vertebra L2. Korda spinalis dilindungi oleh meninges dan tulang vertebra. Vaskularisasi dari korda spinalis berasal dari satu arteri spinalis anterior dan dua arteri spinalis posterior dengan kontribusi tambahan dari arteri radikuler di berbagai titik di sepanjang korda spinalis, yang paling signifikan adalah arteri *Adamkiewicz* yang memasok dua pertiga inferior dari korda spinalis. Drainase vena korda spinalis melalui jaringan kompleks plexus vena tanpa katup (Patek & Stewart, 2020).

Cedera korda spinalis merupakan cedera yang terjadi pada korda spinalis sehingga mengganggu, baik sepenuhnya atau tidak sepenuhnya terhadap fungsi motorik, sensorik, otonom dan refleks. Cedera korda spinalis tetap menjadi penyebab penting morbiditas dan mortalitas dalam masyarakat modern (Dumont et al., 2001). Dalam kasus cedera korda spinalis serabut saraf ascendens yang menyampaikan informasi sensorik dan serabut saraf descendens yang menyampaikan informasi motorik mengalami kerusakan dan mengakibatkan disfungsi pada seluruh bagian tubuh dibawah lesi. Pada lesi korda spinalis

inkomplit, beberapa informasi masih bisa lewat, tetapi seringkali mengalami distorsi sehingga menyebabkan komplikasi neurologis tambahan seperti nyeri kronis (Raineteau & Schwab, 2001).

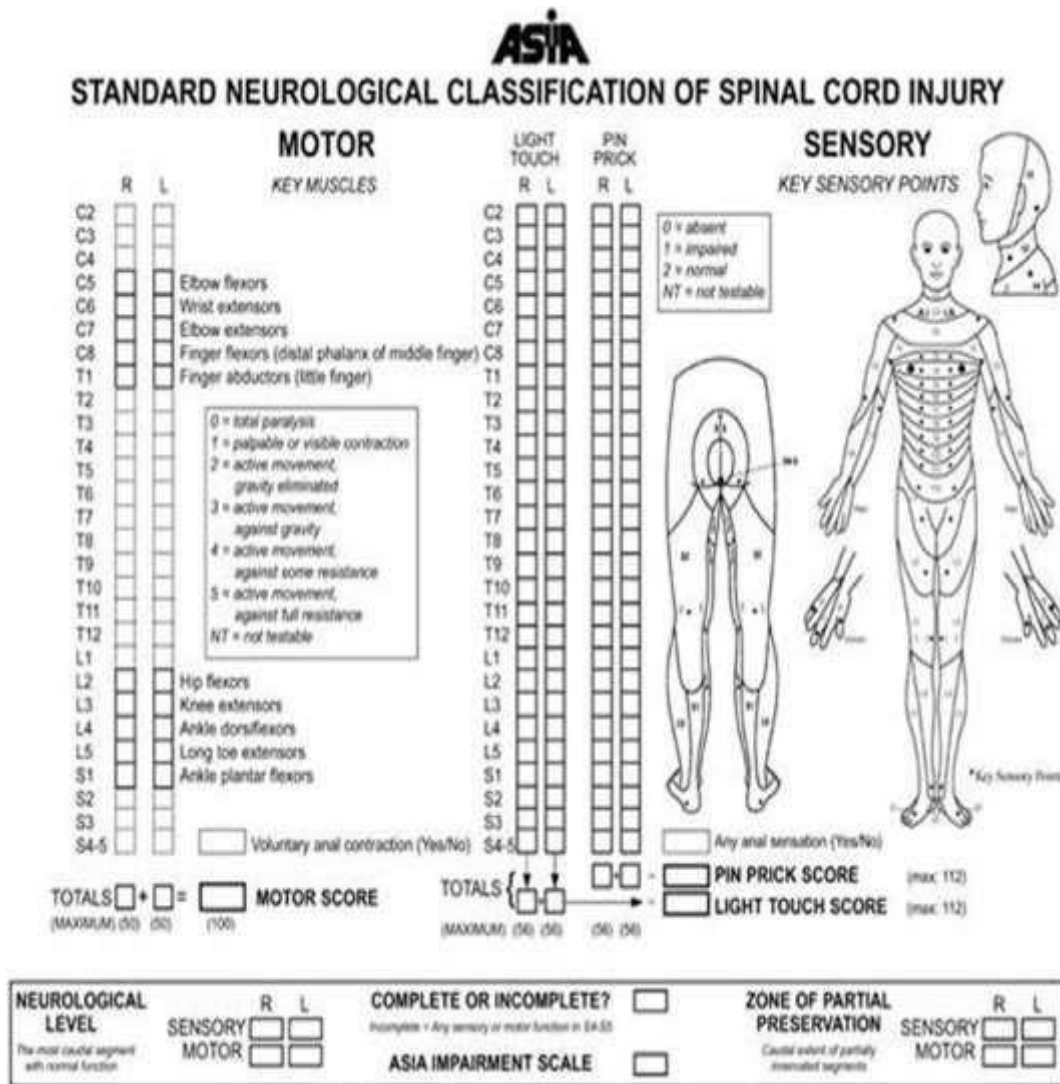
Cedera pada korda spinalis dapat menyebabkan tetraplegia yang menyebabkan gangguan fungsi pada tungkai atas dan tungkai bawah. Cedera korda spinalis servikal bagian atas dapat menyebabkan kelumpuhan diafragma dan gangguan pernapasan. Cedera pada korda spinalis toraks, konus atau kauda equina dapat menyebabkan paraplegia (Mataliotakis & Tsirikos, 2016).

2.1.2 Klasifikasi Cedera Korda Spinalis

Klasifikasi cedera korda spinalis diklasifikasikan secara umum menjadi komplit dan inkomplit berdasarkan definisi dari "*sacral sparing*" mengacu pada adanya fungsi sensorik dan motorik di sebagian besar segmen sakral kaudal yang didapatkan dari adanya sensasi sentuhan ringan atau tusukan jarum pada dermatom S4-S5 dan kontraksi sfingter ani secara volunter. Cedera komplit di definisikan sebagai absennya *sacral sparing*, sebaliknya cedera inkomplit didefinisikan dengan adanya *sacral sparing*.

Klasifikasi *American Spinal Injury Association* (ASIA) dibagi menjadi lima huruf yang mengklasifikasikan tingkat keparahan cedera korda spinalis (Kirshblum et al., 2011; Taghva et al., 2012):

- A. Komplit: tidak ada fungsi motorik dan sensorik di segmen sakral S4-S5.
- B. Inkomplit: fungsi sensorik masih baik, tetapi fungsi motorik terganggu sampai segmen S4-S5.
- C. Inkomplit: fungsi motorik terganggu di bawah level neurologis, tapi otot motorik utama mempunyai kekuatan < 3.
- D. Inkomplit: fungsi motorik terganggu di bawah level neurologis, tapi otot motorik utama mempunyai kekuatan > 3.
- E. Normal: fungsi motorik dan sensorik normal.



Gambar 2.1 Diagram klasifikasi ASIA untuk pemeriksaan cedera korda spinalis
 Sumber: Taghva et al., 2012

2.1.3 Patofisiologi Cedera Korda Spinalis

Penelitian langsung terhadap patofisiologi cedera korda spinalis pada jaringan postmortem manusia tidak memungkinkan, sehingga model hewan dikembangkan sebagai pengganti, hampir semua pemahaman rinci tentang patofisiologi cedera korda spinalis diperoleh melalui penelitian terhadap hewan. Setiap model harus relevan dengan patofisiologi cedera korda spinalis pada manusia, termasuk dapat direproduksi dan dapat dilakukan pada berbagai mekanisme cedera yang berbeda. Sehingga model hewan menjadi pilihan,

karena cocok dengan cedera korda spinalis manusia dalam hal MRI resolusi tinggi dan elektrofisiologis (Ahmed & Lucas, 2020; Rowland et al., 2008).

Kemajuan penting dalam pemahaman kita tentang cedera korda spinalis adalah terjadinya periode kerusakan jaringan yang berkepanjangan setelah terjadi cedera pada korda spinalis. Dengan demikian patofisiologi cedera korda spinalis terdiri dari fase cedera primer dan sekunder. Fase primer melibatkan cedera mekanis awal dimana fraktur dan/atau dislokasi dari vertebra secara langsung memberikan gaya terhadap korda spinalis sehingga mengganggu axon, pembuluh darah dan membran sel. Cedera sekunder mengacu pada kerusakan progresif yang tertunda yang berlanjut setelah cedera primer dan dapat berlangsung selama berminggu-minggu atau bahkan bertahun-tahun. Cedera sekunder melibatkan disfungsi vaskular, edema, iskemia, eksitotoksisitas, pergeseran elektrolit, produksi radikal bebas, inflamasi dan kematian sel. Sedangkan defisit neurologis muncul segera setelah cedera awal, fase cedera sekunder mengakibatkan kerusakan jaringan yang berkepanjangan (Hawryluk et al., 2017; Rowland et al., 2008).

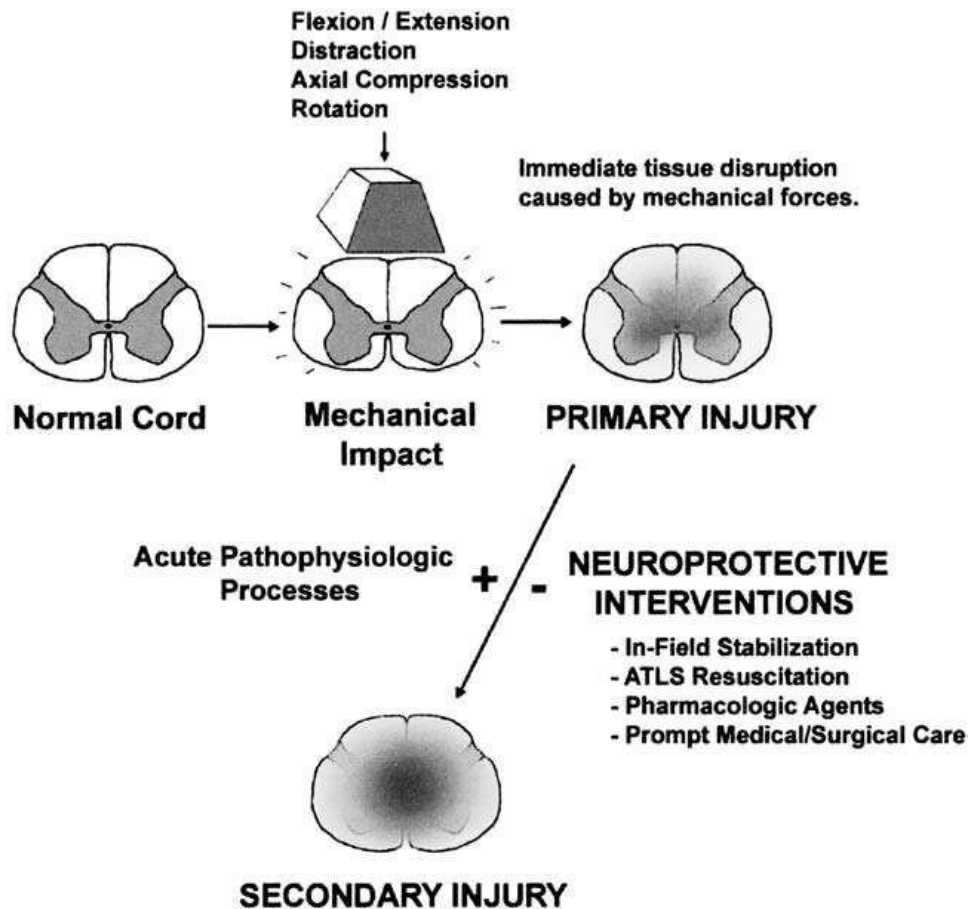
Tabel 2.1 Fase dan kejadian penting setelah cedera korda spinalis

Fase Setelah Terjadi Cedera Korda Spinalis					
Fase dan Peristiwa Penting	≤ 2 Jam	≤ 48 Jam	≤ 14 Hari	≤ 6 Bulan	≥ 6 Bulan
Fase Cedera	Primer Segera (<i>Immediate</i>)	Akut Dini (<i>Early Acute</i>)	Sekunder Subakut (<i>Subacute</i>)	Menengah (<i>Intermediate</i>)	Kronik (<i>Chronic</i>)
Proses Penting dan Kejadian-Kejadian	<p>Cedera Mekanik Primer</p> <p>Pemutusan akson secara traumatis</p> <p>Perdarahan pada substansia grisea</p> <p>Nekrosis hemoragik</p> <p>Aktivasi mikroglia</p> <p>Pelepasan faktor: IL-1β, TNFα, IL-6, & dan lain-lain</p>	<p>Vasogenik dan edema sitotoksik</p> <p>Produksi ROS: Peroksidasi Lipid</p> <p>Eksitotoksisitas yang dimediasi glutamat</p> <p>Perdarahan berlanjut dan nekrosis</p> <p>Invasi Neutrofil</p> <p>Permeabilitas puncak <i>BBB</i></p> <p>Demyelinisasi dini (kematian oligodendrosit)</p>	<p>Infiltrasi makrofag</p> <p>Inisiasi dari <i>astroglial scar</i> (Astrositosis reaktif)</p> <p>Perbaikan <i>BBB</i> dan resolusi edema</p>	<p>Pembentukan bekas luka glial yang berlanjut</p> <p>Pembentukan kista</p> <p>Stabilisasi lesi</p>	<p>Degenerasi <i>Wallerian</i> berkepanjangan</p> <p>Demyelinasi axon</p> <p>Potensi plastisitas jaringan sehat</p>

Lanjutan Tabel 2.1

		Kematian saraf Pembengkakan akson Efek sistemik, (syok sistemik, syok spinalis, hipotensi, hipoksia)		
Tujuan Terapi	Neuroproteksi	Neuroproteksi Modulasi imunitas Pendekatan remyelinisasi struktur dasar sel Degradasi jaringan parut glial	Degradasi jaringan parut glial	Rehabilitasi <i>Neuroprostheses</i>

Sumber: Rowland et al., 2008



Gambar 2.2 Kerusakan primer dan sekunder setelah cedera korda spinalis

Sumber: Kwon et al., 2004

2.1.4 Cedera Korda Spinalis Primer

Cedera korda spinalis primer dihasilkan dari kekuatan fisik yang terjadi pada saat cedera dan merupakan penentu terpenting dari tingkat keparahan cedera korda spinalis. Cedera korda spinalis biasanya terjadi akibat dampak traumatis yang tiba-tiba pada vertebra yang menyebabkan fraktur dan dislokasi. Empat mekanisme karakteristik utama dari cedera primer telah diidentifikasi yang meliputi: (1) *impact* dengan *persistent compression*; (2) *impact* dengan *transient compression*; (3) distraksi; (4) laserasi atau transeksi (Alizadeh et al., 2019; Hawryluk et al., 2017).

Bentuk paling umum dari cedera primer adalah *Impact* dengan *persistent compression*, yang biasanya terjadi pada fraktur tipe *burst* dengan fragmen tulang menekan korda spinalis atau melalui cedera fraktur-dislokasi. *Impact* dengan *transient compression* lebih jarang terjadi tetapi paling sering terjadi pada

cedera hiperekstensi. Cedera distraksi terjadi ketika dua vertebra yang berdekatan tertarik terpisah menyebabkan columna vertebra meregang dan robek pada bidang aksial. Terakhir, cedera laserasi dan transeksi terjadi melalui cedera misil, dislokasi parah, atau dislokasi fragmen tulang yang tajam dan dapat sangat bervariasi dari cedera ringan hingga transeksi lengkap (Alizadeh et al., 2019).

2.1.5 Cedera Korda Spinalis Sekunder

Diketahui bahwa periode cedera jaringan korda spinalis yang progresif dan berkepanjangan terjadi setelah fase cedera primer. Karena proses seluler yang terkait dan merugikan ini menyebabkan hilangnya sel dan aksonal secara tertunda dan hal ini merupakan target terapeutik potensial. Selain itu, mekanisme ini juga terlihat dalam bentuk lain cedera sistem saraf pusat (SSP), seperti cedera otak dan stroke. Proses cedera korda spinalis sekunder ini termasuk apoptosis, iskemia, kerusakan sel yang dimediasi ion dan eksitotoksitas, neuroinflamasi, disfungsi mitokondria dan kerusakan sel oksidatif (Hawryluk et al., 2017).

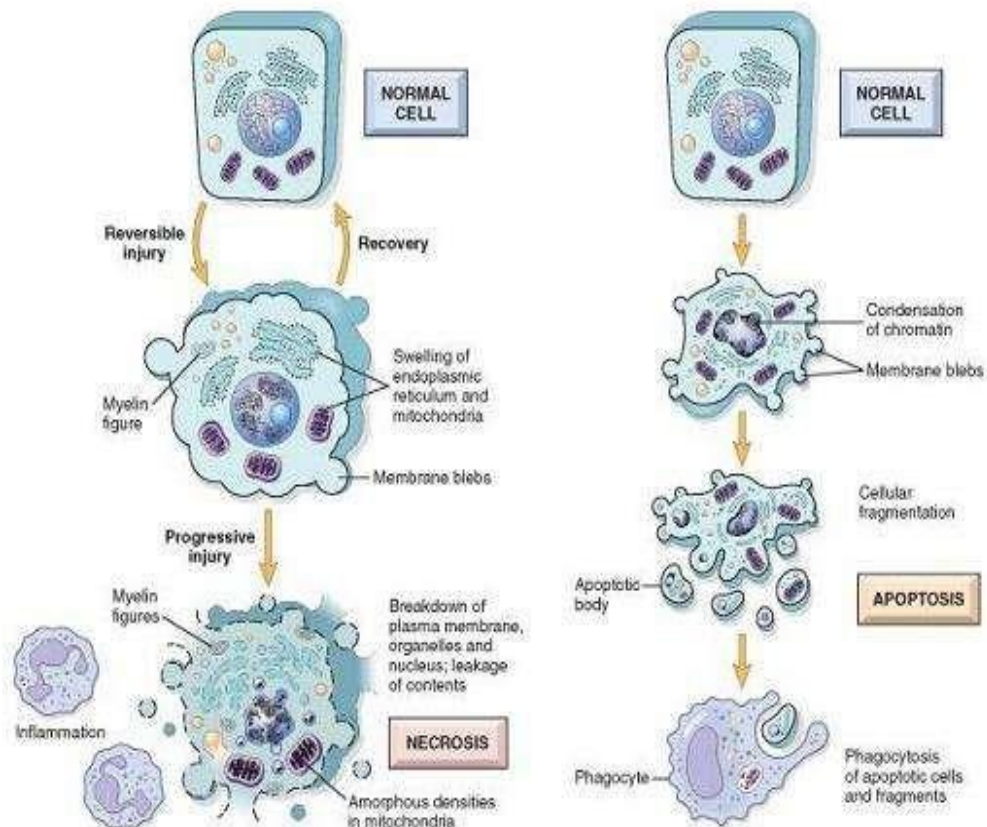
Kematian Sel.

Terdapat dua jenis utama kematian sel: nekrosis dan apoptosis. Kedua jenis tersebut ditemukan pada cedera korda spinalis. Penelitian terbaru juga berfokus pada perubahan protein autofagi, ekspresi protein dan keterlibatan autofagi setelah cedera korda spinalis (Qin et al., 2014).

Apoptosis secara umum diartikan sebagai kematian sel terprogram berbeda dari nekrosis karena membutuhkan energi dan sintesis protein *de novo*. Apoptosis penting dalam mengeliminasi sel yang tidak diinginkan selama perkembangan, dan dalam regulasi sistem imun, dan semua sel tampaknya memiliki kemampuan yang diperlukan untuk menghasilkan kematian dengan cara penghancuran terkendali DNA (Beattie et al., 2002).

Terdapat perbedaan antara nekrosis dan apoptosis (gambar 2.3). Pada nekrosis, tahapan proses kematian dimulai dari pembengkakan retikulum endoplasma (RE) dan mitokondria, sehingga timbul *bleb* pada permukaan sel dan diakhiri dengan pecahnya membran plasma, organela dan isi sel.

Sedangkan pada apoptosis, proses kematian sel dimulai dari kondensasi kromatin, terbentuknya membran sehingga terjadi fragmentasi sel dimana masing-masing fragmen berisi organela dan terbungkus oleh membran yang utuh dan akan akan difatogositosis oleh sel sekitarnya atau makrofag (Kumar et al 2008).



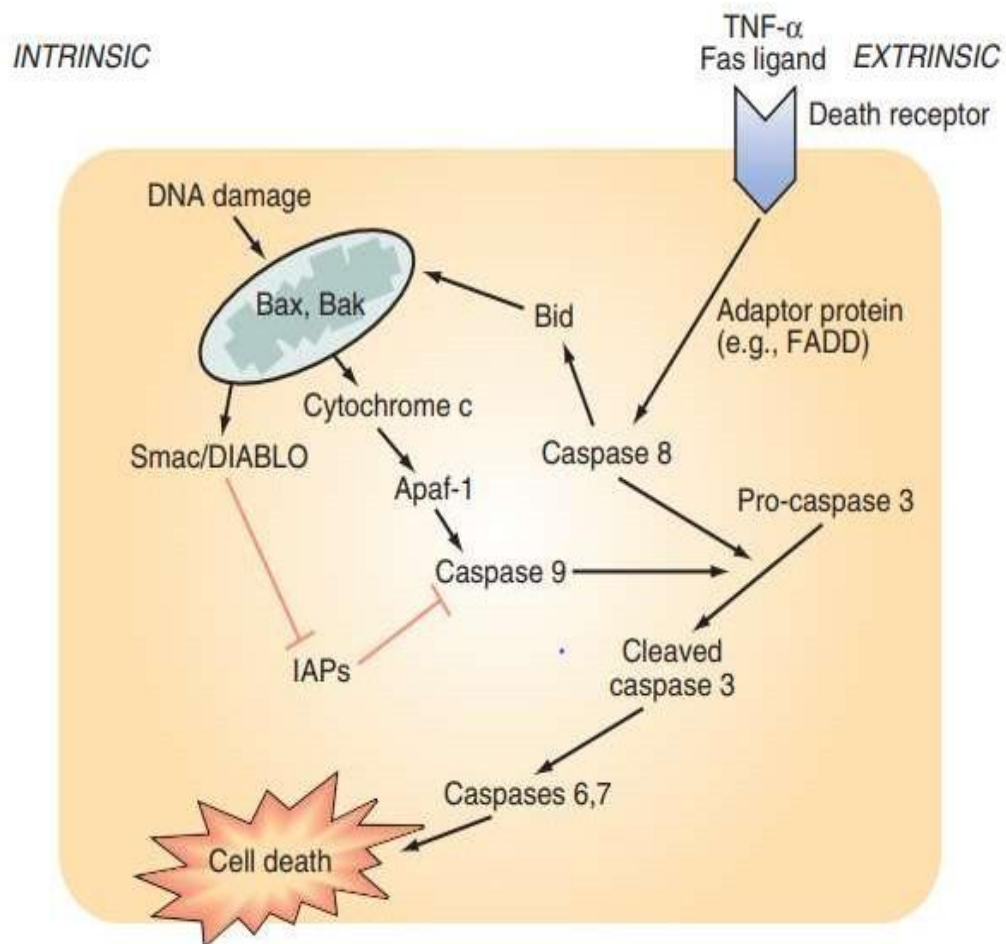
Gambar 2.3 Perbedaan Nekrosis dan Apoptosis

Sumber: Kumar *et al.*, 2008

Apoptosis dapat dipicu oleh sinyal seluler interna atau eksterna dan merupakan jalur akhir dari banyaknya proses cedera korda spinalis sekunder (gambar 2.4). Jalur ekstrinsik dapat diaktifkan ketika *death ligan* seperti Fas/CD95 dan *tumor necrosis factor α* (TNF- α) berikatan dengan reseptor “*death*” mereka. Setelah pengikatan ligan, protein adaptor seperti *Fas-associated protein with death domain* (FADD) terbentuk, akan mengarah ke aktivasi *caspase-8*. Jalur intrinsik dimulai oleh proses patologis intraseluler seperti kerusakan DNA dan peningkatan kadar protein pro apoptosis seperti Bax dan Bak (protein keluarga Bcl-2). Peristiwa ini memicu pelepasan sitokrom c dari mitokondria, yang kemudian mengikat dan mengaktifkan *Apoptic peptidase*

activating factor-1 (Apaf-1), yang selanjutnya dapat mengikat dan mengaktifkan *caspase-9*. *Caspase-8* aktif atau *caspase-9* dapat membelah *caspase-3*, yang memicu apoptosis. Jalur ekstrinsik terhubung ke jalur intrinsik melalui perantara protein Bid, yang menginduksi pelepasan protein mitokondria yang bergantung pada Bax/Bak. Untuk melanjutkan apoptosis, *Inhibitor of Apoptosis proteins* (IAPs) harus dinonaktifkan. Inaktivasi ini dicapai dengan pelepasan protein Smac/DIABLO (*Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis Binding Protein*) dari mitokondria (Alizadeh et al., 2019; Hawryluk et al., 2017).

Blokade apoptosis merupakan target yang layak untuk intervensi terapeutik. Penelitian terbaru menunjukkan kemanjuran potensial dari intervensi apoptosis yang dimediasi oleh Fas dan telah dibuktikan dengan menggunakan sistem *in vitro* (Rowland et al, 2008). Studi post-mortem pada manusia dan model hewan mengungkapkan bahwa apoptosis yang dimediasi fas berperan dalam apoptosis oligodendrosit dan respon inflamasi pada tahap akut dan subakut dari cedera korda spinalis. Tikus yang mengalami defisiensi fas menunjukkan penurunan yang signifikan dalam apoptosis dan respon inflamasi yang dibuktikan dengan berkurangnya infiltrasi makrofag dan ekspresi sitokin inflamasi setelah cedera korda spinalis. Menariknya, tikus yang defisiensi fas menunjukkan pemulihan fungsional yang meningkat secara signifikan setelah cedera korda spinalis sehingga berpotensi sebagai anti-apoptosis untuk cedera korda spinalis (Alizadeh et al., 2019).



Gambar 2.4 Jalur intrinsik dan ekstrinsik apoptosis

Sumber: Hawryluk et al., 2017

Pada apoptosis sel menyusut dan akhirnya difagositosis tanpa induksi respon inflamasi. Kejadian apoptosis tertunda di daerah yang lebih jauh dari lokasi cedera dan paling banyak mempengaruhi oligodendrosit. Pada tikus dengan cedera korda spinalis, apoptosis terjadi paling cepat 4 jam setelah cedera dan mencapai puncaknya pada 7 hari. Di lokasi cedera sebagian besar oligodendrosit hilang dalam waktu 7 hari setelah cedera korda spinalis. Mikroglia dan astrosit juga mengalami apoptosis. Menariknya, apoptosis yang terjadi pada cedera korda spinalis kronis pada model tikus, monyet, dan manusia diperkirakan karena degenerasi akson (Alizadeh et al., 2019).

Hilangnya oligodendrosit akibat apoptosis telah dibuktikan tidak hanya terjadi di lokasi lesi tetapi distal dari episentrum cedera sehingga menyebabkan demielinasi akson yang masih hidup dan gangguan fungsi neuron. Demielinasi menghambat transmisi saraf dengan mengganggu konduksi saltatorial dan juga mengubah distribusi dan fungsi kanal ion. Lokalisasi kanal ion dan fungsi neuron

dapat dipulihkan setelah remielinasi dan diperlukan sebagian kecil akson korda spinalis yang intak untuk memfasilitasi ambulasi, sehingga upaya untuk mempertahankan oligodendrosit atau menambah remielinasi pada cedera korda spinalis menjanjikan potensi terapi (Hawryluk et al., 2017).

Nekrosis menyebabkan kematian neuron dan sel glial akibat kerusakan mekanis pada saat cedera primer yang berlanjut ke tahap cedera akut dan subakut. Nekrosis terjadi karena banyak faktor termasuk akumulasi dari komponen toksik, eksitotoksisitas glutamat dan ketidakseimbangan ion, deplesi ATP, pelepasan sitokin proinflamasi oleh netrofil dan limfosit dan terbentuknya radikal bebas (Alizadeh et al., 2019).

Kematian sel yang disebabkan oleh hipoksia dan eksitotoksisitas telah diteliti ekstensif secara *in vitro*, sekarang telah diketahui bahwa hal ini dapat menyebabkan kematian sel, baik oleh nekrosis, apoptosis, interaksi antara Ca^{2+} intraseluler, radikal bebas, dan mekanisme proteksi sel sangat kompleks (Beattie et al., 2002)

Abnormalitas Vaskular.

Iskemia atau suplai oksigen yang tidak mencukupi untuk memenuhi kebutuhan metabolik dapat disebabkan oleh gangguan vaskular, hipotensi akibat syok hemoragik atau neurogenik, insufisiensi pernapasan, dan secara keseluruhan sering terjadi setelah cedera korda spinalis. Hipoksia sistemik terlihat sangat sering pada pasien dengan cedera korda spinalis karena gangguan otot pernapasan. Terdapatnya cedera pada toraks juga dapat menyebabkan hipoksia dengan mengganggu pertukaran gas di paru-paru. Sehingga pada akhirnya, kekurangan oksigen mengganggu kemampuan rantai transpor elektron untuk menghasilkan *adenosin trifosfat* (ATP). Konsekuensi penting dari kegagalan energi seluler adalah disfungsi dari pompa natrium-kalium yang bergantung pada energi, sehingga menyebabkan edema sitotoksik yang mempengaruhi neuron dan glia. Pembengkakan aksonal menyebabkan blokade potensial aksi. Gangguan respirasi sel juga mengakibatkan asidosis, yang mengganggu fungsi banyak enzim intraseluler sehingga akhirnya dapat menyebabkan kematian sel (Hawryluk et al., 2017).

Gangguan mekanis dari mikrovaskular menyebabkan perdarahan petekie dan trombosis intravaskular, yang dikombinasikan dengan vasospasme pembuluh darah dan edema di lokasi cedera sehingga menyebabkan hipoperfusi

lokal dan iskemia. Hal ini merupakan fenomena mikrovaskular dan biasanya pembuluh darah berkaliber besar seperti arteri spinalis anterior masih dalam keadaan intak. Studi postmortem pada manusia telah menunjukkan bahwa perfusi vaskular secara substansial lebih buruk pada *grey matter* dibandingkan pada *white matter*, yang mungkin terkait dengan gangguan dan/atau trombotik jaringan arteri sulcal yang memasok sebagian besar *grey matter* secara sentrifugal. Kebutuhan metabolik yang tinggi pada neuron membuat *grey matter* sangat sensitif terhadap cedera iskemia, yang dapat diperparah dengan hilangnya mekanisme autoregulasi yang biasanya memberikan kontrol ketat dari hemodinamik mikrovaskular di dalam korda spinalis. Hilangnya autoregulasi, yang biasanya mempertahankan hemodinamik korda spinalis secara konstan selama fluktuasi tekanan darah sistolik antara sekitar 50 hingga 130 mmHg, membuat korda spinalis rentan terhadap tekanan arteri sistemik. Ironisnya, setelah periode iskemia ini, korda spinalis dapat mengalami periode reperfusi sehingga menyebabkan eksaserbasi kerusakan sekunder yang dimediasi oleh radikal bebas (Kwon et al., 2004). Edema di lokasi cedera berkembang dan menyebar secara rostral dan kaudal paralel dengan nekrosis di episentrum lesi dalam 24 – 48 jam setelah trauma (Park et al., 2004).

Eksitotoksisitas dan Disregulasi Ion.

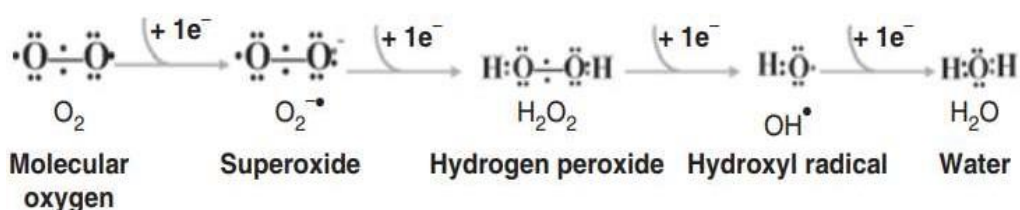
Eksitotoksisitas mengacu pada keadaan patologis yang disebabkan oleh paparan glutamat yang berlebihan atau berkepanjangan dan sering menyebabkan kematian sel neuron. Konsentrasi asam amino eksitatori ekstraseluler meningkat ke tingkat neurotoksik dalam beberapa menit setelah cedera korda spinalis. Kadar asam amino eksitatori ekstraseluler seperti glutamat dan aspartat meningkat dengan cepat karena pelepasannya dari sel yang terdisrupsi atau terminal saraf presinaptik dan kegagalan transporter dependen energi yang biasanya menghilangkannya. Eksitotoksisitas ini menyebabkan masuknya Na^+ dan Ca^{2+} melalui saluran *N-metil-D-aspartate* (NMDA) dan *α -amino-3 hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionate* (AMPA)/*kainate channels* sehingga dapat terjadi kematian sel secara apoptosis atau nekrosis. Untuk alasan ini, blokade reseptor NMDA telah dievaluasi secara ekstensif sebagai pengobatan potensial untuk cedera korda spinalis dan gangguan neurodegeneratif lainnya (Hawryluk et al., 2017; Kwon et al., 2004; Park et al., 2004).

Peningkatan influks Ca^{2+} yang selanjutnya mengganggu kanal Na^+ pada sel, menyebabkan toksisitas ionik yang memulai apoptosis sel saraf dan kematian nekrotik. Selain itu, peningkatan kadar kalsium mengaktifkan sejumlah protein *kinase* dan *fosfolipase*, yang menyebabkan degradasi protein dan kerusakan oksidatif. Proses ini juga terjadi pada *white matter* dan menyebabkan kerusakan pada astrosit, oligodendrosit dan mielin. Efek glutamat tidak hanya terbatas pada neuron karena reseptornya banyak diekspresikan pada permukaan semua glia dan sel endotel. Astrosit juga dapat melepaskan glutamat berlebih secara ekstraseluler setelah peningkatan kadar Ca^{2+} intraselulernya. Berkurangnya kemampuan astrosit yang teraktivasi untuk pengambilan kembali glutamat dari ruang interstisial karena peroksidasi lipid menghasilkan akumulasi glutamat lebih lanjut. Menggunakan mikrodialisis, peningkatan kadar glutamat telah terdeteksi pada *white matter* pada cedera tahap akut. Berdasarkan studi oleh Panter dan rekannya, peningkatan glutamat terdeteksi selama 20-30 menit pertama pasca cedera korda spinalis dan kembali ke level basal setelah 60 menit (Ahmed & Lucas, 2020; Alizadeh et al., 2019).

Kelebihan Ca^{2+} pada mitokondria juga menghambat respirasi mitokondria dan mengakibatkan deplesi ATP yang melumpuhkan Na^+/K^+ ATPase dan meningkatkan Na^+ intraseluler. Selanjutnya, kelebihan Na^+ intraseluler membalikkan aktivitas penukar $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ yang memungkinkan lebih banyak masuknya Ca^{2+} . Depolarisasi seluler mengaktifkan saluran tegangan gerbang kanal Na^+ yang menghasilkan masuknya Cl^- dan air kedalam sel bersamaan dengan masuknya Na^+ dan menyebabkan edema. Peningkatan konsentrasi Na menyebabkan aktivitas yang berlebih dari Na^+/H^+ *exchanger* yang menyebabkan meningkatnya H^+ intraseluler. Asidosis intraseluler yang dihasilkan meningkatkan permeabilitas membran terhadap Ca^{2+} sehingga memperburuk ketidakseimbangan ionik. Akson lebih rentan terhadap kerusakan yang disebabkan oleh ketidakseimbangan ionik karena konsentrasi tegangan gerbang kanal Na^+ di *nodus ranvier*. Banyak bukti menunjukkan bahwa pemberian penghambat kanal Na^+ seperti Riluzole memperkecil kerusakan jaringan dan meningkatkan pemulihan fungsional pada cedera korda spinalis (Alizadeh et al., 2019).

Radikal Bebas dan Peroksidasi Lipid.

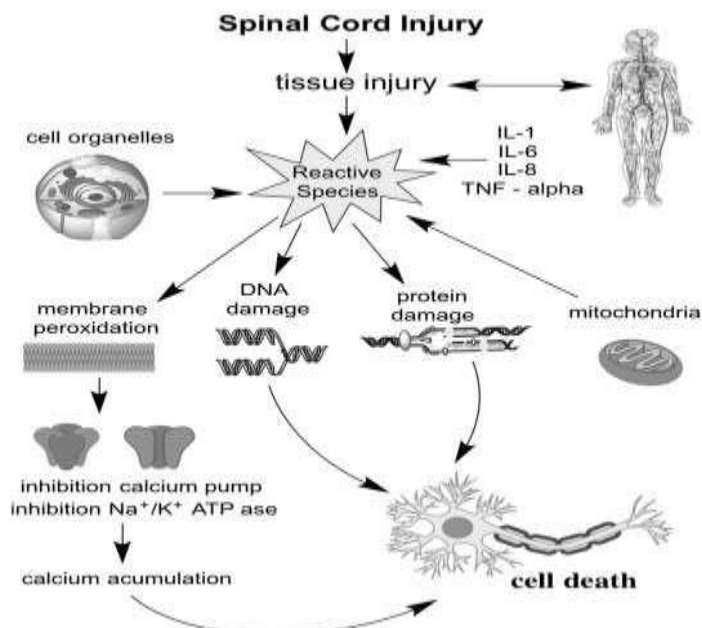
Radikal bebas adalah molekul yang sangat reaktif yang memiliki elektron tidak berpasangan yang membuatnya sangat reaktif terhadap lipid, protein dan DNA. Molekul oksigen (O_2) sendiri memiliki dua elektron yang tidak berpasangan. Penambahan satu elektron ke oksigen menghasilkan superoksida, penambahan dua elektron ke oksigen menghasilkan hidrogen peroksida dan tiga elektron menghasilkan radikal hidroksil yang sangat reaktif. Radikal bebas lain yang sangat reaktif, peroksinitrit ($ONOO^-$), dibentuk oleh interaksi superoksida dengan *nitric oxide* (Alizadeh et al., 2019; Kwon et al., 2004).



Gambar 2.5 Skema pembentukan dari ROS

Sumber: Jia et al., 2012

Kerusakan oksidatif dapat berlanjut selama lima hari (Mataliotakis & Tsirikos, 2016). Penurunan signifikan dari level antioksidan dan peningkatan biomarker dari stres oksidatif dapat terdeteksi dalam sampel plasma dan urin pasien pada 1, 3, dan 12 bulan setelah cedera. Radikal bebas dapat menyebabkan oksidasi progresif pada asam lemak dalam membran sel (peroksidasi lipid), dimana proses oksidasi secara geometris menghasilkan lebih banyak radikal bebas yang dapat menyebarkan reaksi ke seluruh permukaan sel. Radikal bebas juga menyebabkan turunnya aliran darah pada korda spinalis sehingga menyebabkan edema dan respon inflamasi (Alizadeh et al., 2019; Silva et al., 2014; Zhang et al., 2016)



Gambar 2.6 Stres oksidatif pada cedera korda spinalis
 Sumber: Bedreag et al., 2014

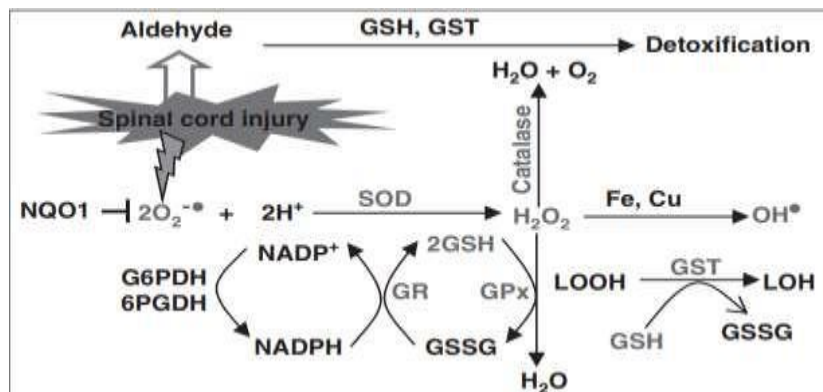
Produksi ROS pada keadaan fisiologis sangat penting untuk reaksi redoks normal seluler. Mitokondria merupakan sumber utama dari ROS seluler karena mitokondria mengonsumsi sekitar 90% oksigen yang digunakan oleh sel selama fosforilasi oksidatif dalam kondisi fisiologis. Disfungsi mitokondria menghasilkan peningkatan pembentukan ROS lebih lanjut. Perubahan struktural dan fungsional dari mitokondria telah ditemukan pada model tikus. Cedera korda spinalis menyebabkan pelepasan asam amino eksitatori dan gangguan homeostasis Ca^{2+} , yang selanjutnya menyebabkan disfungsi mitokondria dan terjadi pembentukan ROS yang meningkat dan menyebabkan kematian sel neuron (Jia et al., 2012).

Selain mitokondria, sel fagositik seperti neutrofil dan makrofag juga berkontribusi pada pembentukan ROS. Setelah cedera korda spinalis, sel fagositik menunjukkan peningkatan yang nyata dalam konsumsi oksigen dan pembentukan superoksida dari nikotinamida yang terkait dengan membran nikotinamida adenin dinukleotida fosfat oksidase. Kompleks enzim mentransfer elektron dari *nikotinamida adenin dinukleotida fosfat oksidase* pada sitosol membran ke molekul oksigen di sisi lain membran yang menghasilkan produksi superoksida ekstrasel. Sel-sel inflamasi akan melepaskan mediator inflamasi, termasuk *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α), interferon, dan interleukin. ROS yang dilepas oleh sel-sel inflamasi dapat membahayakan seperti yang telah dibahas sebelumnya. Respon imun setelah cedera korda spinalis merupakan

target terapi yang menantang karena memiliki efek menguntungkan dan merugikan (Hawryluk et al., 2017; Jia et al., 2012)

ROS berpartisipasi dalam proses fisiologis, seperti pensinyalan sel. Namun, pembentukan ROS yang berlebihan dalam kondisi patofisiologis, termasuk cedera korda spinalis dapat menyebabkan stress oksidatif. Untuk mengendalikan ROS, organisme aerob telah memanfaatkan beberapa mekanisme antioksidan antara lain antioksidan enzimatis dan non enzimatis. Senyawa antioksidan non-enzim dengan berat molekul rendah termasuk *glutathione* seluler, vitamin C dan E, β -caroten, *uric acid*. Enzim antioksidan termasuk *superoksida dismutase* (SOD), *katalase*, *glutathione reductase* dan *glutathione peroxidase*. SOD mengkatalisis perlepasan superoksida menjadi H_2O_2 . Sel mamalia mengandung tiga bentuk SOD, MnSOD, Cu,ZnSOD dan SOD ekstraseluler. MnSOD paling banyak ditemukan di mitokondria, sedangkan Cu,ZnSOD dominan di sitoplasma. Katalase adalah enzim antioksidan utama yang mengkatalisis dekomposisi H_2O_2 menjadi H_2O . *Glutathione peroksidase* adalah enzim utama lain untuk menguraikan H_2O_2 (Jia et al., 2012).

Eliminasi dari ROS setelah cedera korda spinalis dikendalikan oleh *glutathione* antioksidan seluler dan Cu,ZnSOD. Lucas dan rekan, meneliti efek pengobatan *glutathione* pada peroksidasi lipid setelah cedera korda spinalis pada model tikus dengan kontusio. Hasil penelitian mereka menunjukkan bahwa peningkatan kadar *glutathione* memberikan perlindungan yang signifikan terhadap peroksidasi lipid setelah cedera. Hal ini menunjukkan bahwa augmentasi *glutathione* mungkin merupakan strategi yang efektif untuk mengurangi kerusakan yang dimediasi peroksidasi lipid pada cedera korda spinalis. Mutasi pada gen Cu,ZnSOD telah diidentifikasi pada penyakit *amyotrophic lateral sclerosis* (ALS), penyakit yang ditandai dengan kerusakan dan hilangnya neuron di otak dan sumsum tulang belakang. Overekspresi dari *gene wide-type* Cu,ZnSOD menunjukkan resistensi terhadap cedera korda spinalis. Hal ini mengindikasikan peran penting Cu,ZnSOD dalam melindungi dari kematian neuron korda spinalis (Jia et al., 2012).

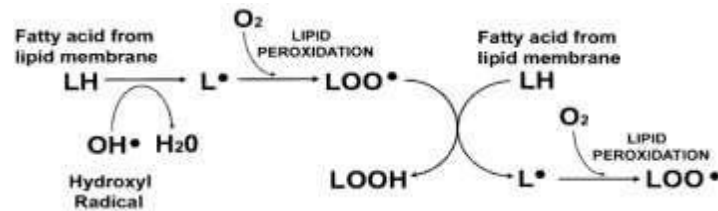


Gambar 2.7 Detoksifikasi ROS oleh antioksidan seluler
Sumber: Jia et al., 2012.

Kerusakan utama pada sel dihasilkan dari induksi ROS terhadap makromolekul seperti *polyunsaturated fatty acid*, lipid, protein dan DNA. Peroksidasi lipid adalah jenis oksidasi seluler yang diinduksi ROS yang sering terjadi dan berbahaya. Telah lama diketahui bahwa sebagian besar degenarasi pasca trauma pada cedera korda spinalis disebabkan oleh proses cedera sekunder dan proses biokimia yang signifikan adalah ROS yang menginduksi peroksidasi lipid. Secara khusus, korda spinalis sangat rentan terhadap cedera oksidatif karena terdapat banyak *polyunsaturated fatty acid* yang sangat rentan terhadap peroksidasi oleh ROS. Pentingnya ROS dan peroksidasi lipid di cedera korda spinalis telah dibuktikan dengan banyaknya penelitian eksperimental dan klinis yang menunjukkan potensi neuroproteksi dari beberapa agen bioaktif dengan sifat antioksidan (Jia et al., 2012).

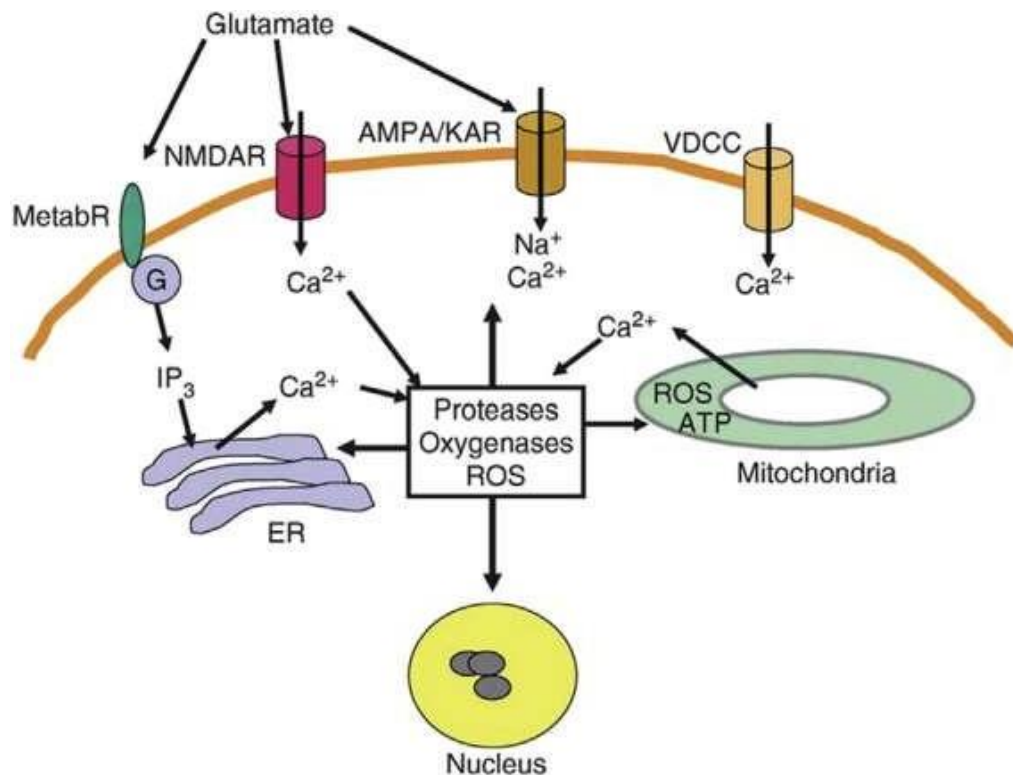
Peroksidasi lipid terjadi ketika ROS berinteraksi dengan *polyunsaturated fatty acid* di membran sel dan menghasilkan lipid reaktif yang kemudian akan membentuk radikal peroksil lipid saat berinteraksi dengan *superoxide* radikal bebas. Setiap radikal peroksil lipid dapat bereaksi dengan asam lemak tetangga, mengubahnya menjadi lipid aktif dan memulai reaksi berantai yang berlanjut hingga tidak ada lagi asam lemak tak jenuh tersedia atau mengalami terminasi dengan radikal lain. Produk akhir dari terminasi peroksidasi lipid ini adalah 4-*hydroxynonenal* (HNE) dan 2-propenal, yang sangat toksik bagi sel. Peroksidasi lipid juga merupakan penyebab ketidakseimbangan ionik melalui membran sel yang tidak stabil seperti membran sitoplasma dan retikulum endoplasma. Selain itu, peroksidasi lipid menyebabkan disfungsi Na^+/K^+ ATPase yang memperburuk kelebihan Na^+ intraseluler. Oksidasi lemak dan protein setelah cedera korda spinalis memiliki sejumlah konsekuensi yang merugikan pada tingkat sel termasuk kegagalan respirasi mitokondria dan metabolisme serta perubahan

DNA yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel. Proses peroksidasi lipid khususnya dianggap sangat penting dalam patofisiologi akut cedera korda spinalis, baik selama periode awal hipoperfusi dan bahkan lebih signifikan selama periode reperfusi. Produk reaksi oksidatif ini, seperti *malonyldialdehyde*, mengalami peningkatan dengan cepat setelah cedera tumpul pada model hewan dengan cedera korda spinalis (Kwon et al., 2004)



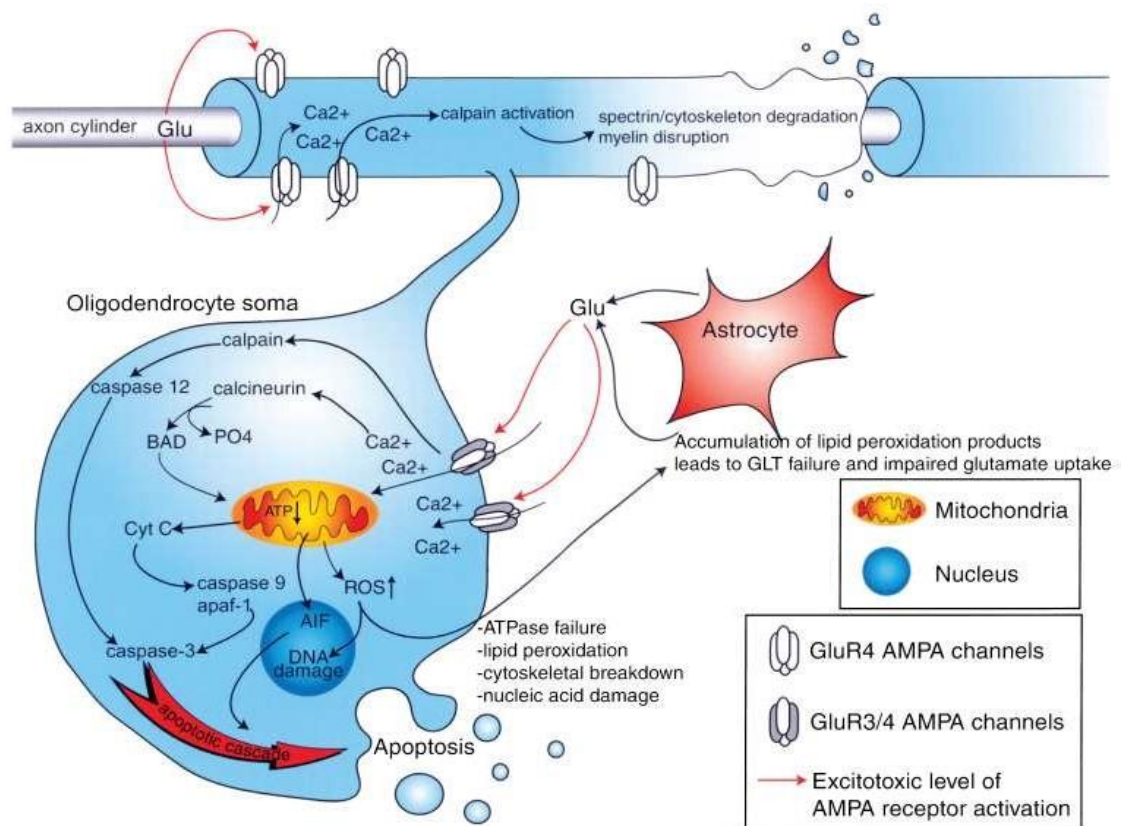
Gambar 2.8 Reaksi berantai peroksidasi lipid yang disebabkan radikal bebas
Sumber: Kwon et al., 2004

Hubungan Antara Eksitotoksitas, ROS dan Kematian Sel.



Gambar 2.9 Mekanisme Eksitotoksitas
Sumber: Mattson, 2019

Mekanisme eksitotoksitas diawali oleh paparan glutamat yang berlebih dan berkepanjangan (gambar 2.7). Glutamat yang berikatan dengan reseptor AMPA dan *reseptor kainate* (KAR) membuka kanal reseptor. Hal ini mengakibatkan masuknya Na^+ dan mengakibatkan depolarisasi membran disertai terbukanya *Voltage-dependent Ca^{2+} channels* (VDCC). Beberapa bentuk reseptor AMPA juga permeabel terhadap Ca^{2+} . Pengikatan glutamat ke *N-metil-d-aspartate reseptor* (NMDAR) dibawah kondisi depolarisasi, mengakibatkan masuknya Ca^{2+} dalam jumlah besar. Aktivasi reseptor glutamat metabotropik (MetR) menginduksi IP_3 dan saluran reseptor *ryanodine* di membran retikulum endoplasma. Sehingga terjadi pelepasan Ca^{2+} dari RE ke dalam sitoplasma. Peningkatan kadar Ca^{2+} sitoplasma sebagai respons terhadap aktivasi reseptor glutamat dapat memicu uptake Ca^{2+} ke dalam mitokondria, yang jika berlebihan dapat menginduksi produksi ROS dan menghambat produksi (ATP). Dengan mengaktifkan protease dan menginduksi stress oksidatif, Ca^{2+} adalah mediator utama kematian sel, bahkan dengan peningkatan kecil konsentrasi Ca^{2+} sitoplasma selama 20-30 menit dapat membunuh neuron (Mattson, 2019).



Gambar 2.10 Mekanisme Eksitotoksitas dan apoptosis pada oligodendrosit
Sumber: Park et al., 2004

Eksitotoksitas juga dapat terjadi pada sel glia dan astrosit (gambar 2.8). Glutamat yang dilepaskan dari silinder aksonal dan astrosit dapat meningkatkan konsentrasi glutamat ekstraseluler ke tingkat eksitotoksik. Ca^{2+} permeable GluR4 yang mengekspresikan reseptor AMPA pada selubung mielin dapat mengaktifkan protease yang sensitif terhadap Ca^{2+} seperti *calpain* yang mengakibatkan degradasi sitoskeletal dan selanjutnya gangguan mielin. Ca^{2+} permeable GluR3/4 yang mengekspresikan reseptor AMPA pada somata oligodendrosit merupakan jalur masuk potensial untuk Ca^{2+} yang memulai sejumlah kaskade molekuler termasuk; aktivasi *calpain* dan berikutnya aktivasi procaspase-12, defosforilasi BAD oleh kalsineurin berkontribusi pada disfungsi mitokondria, pembentukan ROS yang dapat mempengaruhi mekanisme intraseluler atau astrosit yang berdekatan. Ca^{2+} juga bertanggung jawab untuk memenuhi kemampuan *buffer* Ca^{2+} mitokondria dengan mengorbankan pembentukan ATP. Disfungsi mitokondria menghasilkan pelepasan faktor pro apoptosis termasuk *Cyt C*, yang diperlukan untuk pengikatan apaf-1 ke *procaspases-9* serta *Apoptosis Inducing Factor* (AIF), yang memberikan kejadian pro apoptosis di nukleus (Park et al., 2004)

Neuroinflamasi.

Respon neuroinflamasi setelah cedera korda spinalis dimediasi oleh berbagai jenis sel, termasuk astrosit, mikroglia residen, sel imun infiltrasi, dan sel endotel, yang membentuk lapisan pembuluh. Korda spinalis memiliki respons inflamasi yang lebih serius terhadap cedera dari pada otak, dengan dua kali lebih banyak infiltrasi neutrofil dalam waktu 24 jam, infiltrasi makrofag yang berkelanjutan, dan infiltrasi limfosit yang meningkat (Rust & Kaiser, 2017).

Pada awal cedera hingga hari ke-2 respon inflamasi yang terjadi berupa perpindahan mikroglia, astrosit, dan neutrofil ke lokasi cedera. Astrosit bereaksi terhadap cedera secara akut dengan meningkatkan produksi sitokin dan kemokin. Hal ini mendorong jalur inflamasi, merekrut neutrofil dan menyebabkan kerusakan sel lebih lanjut. Neutrofil berkontribusi pada fagositosis, pembersihan debris jaringan, melepaskan sitokin, protease dan radikal bebas. Kontribusi neutrofil mengarah pada penyebaran proses inflamasi yang merusak. Namun, eliminasi neutrofil membahayakan penyembuhan jaringan lebih lanjut dan menghambat pemulihan fungsional, karena neutrofil juga memainkan peran dalam proses perbaikan (Ahmed et al, 2020). Akumulasi neutrofil pasca trauma,

yang diukur dengan aktifitas *myeloperoxidase* (MPO), meningkat secara signifikan dalam 3 jam dan tetap meningkat hingga 3 hari setelah cedera korda spinalis (Hausmann, 2003).

Pada hari ke-3 dan seterusnya terjadi perkerutan makrofag yang terbawa di dalam darah, limfosit B dan limfosit T. Limfosit T menjadi aktif setelah presentasi antigen oleh makrofag dan sel mikroglia. Limfosit T yang diaktifkan dan sel T helper menghasilkan sitokin yang merangsang produksi antibodi sel B dan mengaktifkan fagositosis. Selain itu, sel B menghasilkan antibodi terhadap sel SSP yang memperburuk proses inflamasi yang berlanjut ke fase kronis, sehingga menyebabkan kerusakan sel yang berlanjut hingga beberapa tahun setelah cedera awal (Ahmed & Lucas, 2020).

Dalam beberapa tahun terakhir, pemahaman tentang peran fungsional dari respon inflamasi setelah cedera korda spinalis telah berkembang secara signifikan. Proses inflamasi memiliki efek ganda berupa efek menguntungkan dan merugikan yang masing-masing mendorong perbaikan atau degenerasi jaringan. Di satu sisi, mikroglia yang teraktivasi di korda spinalis yang cedera menghasilkan berbagai sitokin proinflamasi, termasuk IL-1, TNF- α , ROS dan NOS, protease dan faktor sitotoksik lainnya. Infus antagonis IL-1 selama 72 jam setelah cedera korda spinalis pada model tikus secara nyata mengurangi apoptosis akibat cedera, hal ini menunjukkan bahwa ekspresi awal IL-1 memiliki efek yang merugikan. Selain itu, netralisasi TNF- α meningkatkan pemulihan fungsional dan mengurangi apoptosis dan kehilangan jaringan setelah cedera korda spinalis. Selain efek merugikan dari TNF- α , pensinyalan TNF- α yang tepat tampaknya diperlukan untuk remielinasi dengan mempromosikan proliferasi dari progenitor oligodendrosit (Hausmann, 2003; Rust & Kaiser, 2017).

Setelah invasi neutrofil, mikroglia/ makrofag mengisi korda spinalis yang terluka dalam 2-3 hari setelah cedera. Populasi makrofag berasal dari invasi monosit yang berasal melalui darah atau berasal dari makrofag residen SSP yang berada di daerah perivaskular di dalam ruang meninges dan subarachnoid. Populasi mikroglia/ makrofag mencapai puncaknya pada 7-10 hari setelah cedera pada tikus, diikuti dengan penurunan pada fase subakut dan kronis. Sementara makrofag dan mikroglia memiliki banyak fungsi dan penanda imunologi, mereka memiliki asal yang berbeda. Mikroglia adalah sel imun residen dari SSP yang berasal dari kantung *yolk sac* selama periode embrionik. Makrofag berasal dari monosit darah, yang berasal dari keturunan myeloid di sumsum tulang. Setelah

cedera, gangguan akut dari *blood-spinal cord barrier* (BSCB) memungkinkan monosit, untuk menyusup ke jaringan korda spinalis dan berubah menjadi makrofag. Makrofag menempati episentrum cedera, sedangkan mikroglia residen terutama terletak di daerah perilesional. Setelah diaktifkan, makrofag, dan mikroglia secara morfologis dan imunohistologis tidak dapat dibedakan. Makrofag dan mikroglia memainkan peran yang bermanfaat dalam regenerasi SSP. Mereka mempromosikan proses perbaikan dengan ekspresi faktor pemacu pertumbuhan seperti *nerve growth factor* (NGF), *neurotrophin-3* (NT-3) dan trombospondin. Makrofag dan mikroglia penting untuk proses penyembuhan luka setelah cedera korda spinalis karena kemampuannya untuk fagositosis dan membersihkan sel-sel yang rusak dan puing-puing mielin setelah cedera korda spinalis (Alizadeh et al., 2019).

Berdasarkan sinyal *microenvironmental*, makrofag / mikroglia dapat terpolarisasi menjadi fenotipe proinflamasi (M1-like) atau anti inflamasi pro regeneratif (M2-like), dan karenanya berkontribusi pada cedera atau proses perbaikan setelah cedera korda spinalis. Apakah mikroglia dan makrofag memiliki kemampuan untuk berpolarisasi atau merupakan properti makrofag turunan monosit masih menjadi bahan perdebatan dan perlu penjelasan lebih lanjut. Beberapa bukti menunjukkan bahwa proinflamasi M1-like mikroglia / makrofag dapat diinduksi oleh paparan sitokin spesifik T_H1 , *interferon* (IFN) γ . Menurut Kigerl dan rekan liposakarida dan sitokin proinflamasi dapat mempromosikan diferensiasi dari M1 makrofag. Sel-sel ini menghasilkan metabolit oksidatif tingkat tinggi (misalnya, *nitric oxide* dan *superoxide*) dan sitokin proinflamasi yang penting untuk pertahanan tubuh dan membunuh sel tumor, tetapi juga menyebabkan kerusakan tambahan pada sel / jaringan yang sehat (Alizadeh et al., 2019; Kigerl et al., 2009).

Selain itu, *microenvironmental* cedera korda spinalis tampaknya mendorong polarisasi M1 dari makrofag yang teraktivasi. Studi cedera korda spinalis telah mengungkapkan bahwa peningkatan kadar sitokin proinflamasi, TNF- α , dan akumulasi zat besi intraseluler mendorong fenotipe proinflamasi M1-like pada makrofag setelah cedera. Hal penting lainnya, setelah cedera korda spinalis, mikroglia / makrofag M1-like yang teraktivasi mengekspresikan MHCII dan mempresentasikan antigen ke sel T dan berkontribusi pada aktivasi dan regulasi respons imun bawaan dan adaptif. Studi pada cedera korda spinalis akut dan subakut serta model *experimental autoimmune encephalomyelitis* (EAE)

telah menunjukkan bahwa makrofag M1-like dikaitkan dengan ekspresi yang lebih tinggi pada *chondroitin sulfate proteoglycans* (CSPGs) dan peningkatan keparahan EAE dan kerusakan jaringan. In vitro, penambahan makrofag M1-like yang teraktivasi ke kultur *dorsal root ganglia* (DRG) menyebabkan retraksi aksonal dan kegagalan regenerasi karena ekspresi CSPG jauh lebih tinggi pada makrofag M1-like dibandingkan dengan makrofag M2-like. Studi menunjukkan bahwa CSPG, penghambat potensial pertumbuhan akson, 17 kali lipat lebih banyak di M1 daripada di M2, menunjukkan bahwa M1 juga dapat menekan regenerasi neuron setelah cedera (Alizadeh et al., 2019; Kong & Gao, 2017).

Makrofag M1-like juga menghasilkan faktor repulsif lain seperti *repulsive guidance molecule A* (RGMA) yang ditunjukkan untuk menginduksi retraksi aksonal setelah cedera korda spinalis. Menariknya, bukti terbaru menunjukkan bahwa mikroglia M1 terpolarisasi IFN- γ dan TNF α menunjukkan penurunan kapasitas untuk fagositosis, sebuah proses yang sangat penting untuk perbaikan jaringan setelah cedera (Alizadeh et al., 2019).

Mikroglia / makrofag M2-like pro-regeneratif, dipolarisasi oleh sitokin T_H2, IL-4 dan IL-13 dan menunjukkan tingkat IL-10, TGF- β , dan arginase-1 yang tinggi dengan aktivitas jalur NF- κ B yang berkurang. IL-10 adalah sitokin imunoregulasi kuat dengan peran positif dalam perbaikan dan regenerasi setelah cedera SSP. Kekurangan IL-10 juga berkorelasi dengan tingkat regulasi faktor pro apoptosis seperti Bax dan penurunan ekspresi faktor anti apoptosis seperti Bcl-2 (245). Tikus dengan cedera korda spinalis yang kekurangan IL-10 menunjukkan pemulihan fungsi yang lebih buruk dibandingkan dengan *wild-type mice*. Studi terbaru Alizadeh dan rekan menunjukkan bahwa mikroglia M2 terpolarisasi IL-10 menunjukkan peningkatan kapasitas untuk fagositosis. Alizadeh dan rekan juga menemukan bahwa mikroglia terpolarisasi M2 meningkatkan kemampuan sel prekursor saraf untuk diferensiasi oligodendrosit melalui mekanisme yang dimediasi oleh IL-10. Selain modulasi imun, mikroglia/ makrofag M2-like mendorong regenerasi aksonal. Namun, mirip dengan efek merugikan dari respons makrofag M1 yang berkepanjangan, aktivitas M2-like yang berlebihan mendorong pembentukan jaringan parut fibrotik melalui pelepasan faktor-faktor seperti TGF- β , *platelet derived growth factor* (PDGF), *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1), dan *Galectin-3*. Oleh karena itu, keseimbangan antara proinflamasi M1 dan respons makrofag/

mikroglia M2 proregeneratif bermanfaat untuk perbaikan cedera korda spinalis (Alizadeh et al., 2019).

2.2 MLC901

MLC901 (NeuroAiD II) merupakan kombinasi dari 9 komponen herbal dan diindikasikan sebagai pengobatan untuk pemulihan stroke yang banyak digunakan di Cina dan banyak negara di Asia. Kemanjuran dan keamanan MLC901 telah didukung oleh studi praklinis dan klinis. MLC901 memiliki sifat neuroprotektif dan neuroproliferatif dan telah dijelaskan secara luas selama percobaan *in vitro* dan *in vivo* menggunakan model hewan. MLC901 memfasilitasi restorasi sirkuit neuron melalui efek antioksidan, promosi dari proliferasi sel dan stimulasi dari akson dan dendrit sirkuit neuron setelah cedera otak. Efek positif dari MLC901 terletak pada efek neurogenesis dan neurorestorasi dibandingkan efek neuroproteksinya.

Pada model tikus pemberian MLC901 telah terbukti mencegah kematian sel dan merangsang pembentukan koneksi dan jalur sel saraf baru. Tikus yang diberikan MLC901 cedera iskemik menunjukkan peningkatan kelangsungan hidup, pemulihan neurologis, penurunan neurodegenerasi dan meningkatkan fungsi kognitif (Kumar et al., 2016; Quintard et al., 2011, 2014; Suwanwela et al., 2018; Theadom et al., 2018).

2.2.1 Efek Neuroproteksi

Konsisten dengan observasi kemanjuran MLC601 pada manusia, studi yang dilakukan oleh Heurteaux dan rekan menunjukkan data farmakologis yang diperoleh dari model tikus telah menunjukkan bahwa MLC901 mencegah kematian neuron, menurunkan defisit kognitif dan meningkatkan hasil fungsional dengan memulihkan sirkuit saraf (Heurteaux et al., 2010, 2013; Quintard et al., 2011).

Menggunakan model tikus dengan iskemia fokal yang diinduksi oleh oklusi transien arteri cerebri media selama 60 menit, menunjukkan bahwa pengobatan MLC901, bila diberikan sebelum atau sesudah pengobatan,

meningkatkan kelangsungan hidup hewan serta pemulihan neurologis fungsional dan penurunan neurodegenerasi tanpa mempengaruhi parameter fisiologis. Pemberian MLC901 intraperitoneal secara akut (1 µg/tikus dalam bolus 500 µl) menginduksi tingkat kelangsungan hidup yang tinggi dan secara drastis menurunkan infark serebral dengan penurunan volume stroke sekitar 50% dibandingkan dengan tikus kontrol pada 30 jam setelah iskemia. MLC901 juga efektif dalam pencegahan, karena pengobatan awal MLC901 selama 6 minggu yang diberikan dalam air minum (6 mg/ml) sebelum induksi iskemia menyebabkan penurunan yang nyata dari kematian hewan yang dirawat dan penurunan infark otak mereka. (Heurteaux et al., 2013)

Pada model tikus dengan iskemia global yang disebabkan oleh oklusi empat pembuluh darah utama selama 20 menit, dimana metode oklusi tersebut meniru serangan jantung mendadak dan resusitasi kardiopulmoner pada manusia, MLC901, ketika diberikan secara intraperitoneal setelah oklusi (0,074 mg / ml dalam bolus 500 µl/tikus) selama 7 hari, menunjukkan sangat penurunan drastis kematian neuron baik secara nekrotik dan apoptosis pada hipokampus yang rentan setelah 1 minggu reperfusi. Menariknya, MLC901 memberikan perlindungan dari iskemia fokal dan global pada hewan pengerat ketika diberikan paling lambat 3 jam setelah iskemia (Heurteaux et al., 2013; Quintard et al., 2011).

Peningkatan fungsi neurologis yang terganggu oleh iskemia menegaskan efisiensi farmakologis MLC901. Memang, perlindungan MLC901 disertai dengan penurunan defisit perilaku pada kedua model (fokal dan global) iskemia, sejalan dengan hasil klinis pertama yang menjanjikan dari efisiensi MLC601/MLC 901 pada pemulihan fungsional setelah stroke. MLC901 meningkatkan kinerja motorik yang diukur dalam tes rotarod, aktimeter dan *Morris water maze test*, yang dianggap sebagai prosedur yang berguna untuk menilai defisit setelah iskemia. Tiga dan tujuh hari setelah iskemia fokal, tikus yang diobati dengan MLC901 menunjukkan peningkatan yang signifikan dari penampilan mereka pada rotarod dan aktimeter dibandingkan dengan kelompok *vehicle*. Perbaikan fungsional yang diinduksi oleh MLC901 secara signifikan berkorelasi dengan penurunan volume infark. MLC901 juga meningkatkan pemulihan fungsional setelah iskemia global seperti yang dinilai pada *Morris water maze test* dan tes kekuatan cengkeraman. MLC901 mengurangi peningkatan *escape latency* dan jarak renang yang disebabkan oleh iskemia pada *Morris water maze test* dan

meningkatkan kekuatan cengkeraman pasca iskemik pada tes kekuatan cengkeraman.(Heurteaux et al., 2013; Quintard et al., 2011).

Neuron sangat rentan terhadap cedera hipoksia dan eksitotoksik. Kemanjuran MLC901 juga telah dibuktikan dalam model deprivasi oksigen dan glukosa yang meniru penipisan cepat oksigen dan glukosa yang terlihat dalam kondisi iskemik *in vivo*. Kekurangan oksigen dan glukosa selama 2 jam pada neuron kortikal menyebabkan pembengkakan saraf segera, diikuti oleh masuknya Ca^{2+} dan degenerasi neuron selama 24 jam berikutnya, disertai dengan pelepasan dehidrogenase laktat. MLC901 menurunkan influks Ca^{2+} yang berlebihan dan kemudian melemahkan eksitotoksitas yang diinduksi oleh kekurangan glukosa oksigen. Telah ditunjukkan secara paralel bahwa MLC901 juga menginduksi efek perlindungan yang kuat terhadap kematian sel yang diinduksi glutamat, efek yang dipertahankan selama 24 jam setelah cedera eksitotoksik pada kultur neuron kortikal. Cedera otak setelah iskemia terjadi akibat interaksi yang kompleks dari beberapa jalur termasuk eksitotoksitas, asidosis, ketidakseimbangan ionik, depolarisasi peri-infarct, stres oksidatif, peradangan dan apoptosis. Oleh karena itu, diharapkan bahwa efek menguntungkan dari MLC901 akan disebabkan oleh efek *multitarget*.(Doyle et al., 2008; Heurteaux et al., 2010, 2013; Moha Ou Maati et al., 2012).

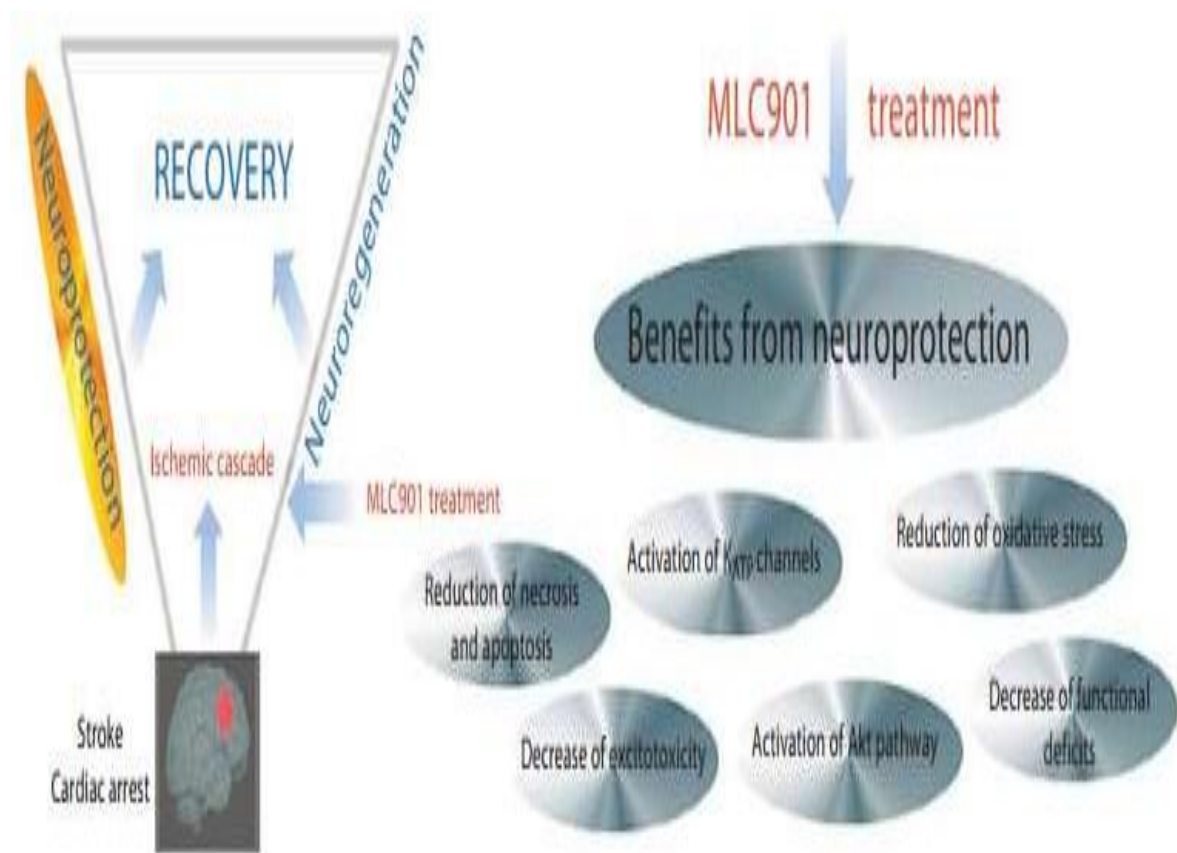
Pertama, efek pelindung saraf MLC901 dikaitkan dengan hiperpolarisasi besar yang memiliki sifat antagonis terhadap glibenklamid, penghambat spesifik kanal K^+ sensitif ATP (K_{ATP}). Aktivasi kanal K_{ATP} adalah langkah kunci dalam efek menguntungkan dari prekondisi iskemik dan telah diusulkan sebagai cara untuk menjadi pelindung saraf terhadap iskemia otak. Eksperimen elektrofisiologi pada neuron kortikal tikus telah menunjukkan bahwa MLC901 bertindak sebagai aktivator kanal K_{ATP} sama kuatnya dengan pinacidil, pembuka kanal K_{ATP} klasik. Efek ini mengonfirmasi bahwa koekspresi SUR1 dan Kir6.2, dua subunit utama dari kanal K_{ATP} neuronal, yang mengarah ke ekspresi kanal kalium, secara potensial diaktifkan oleh MLC901 (Heurteaux et al., 2013; Moha Ou Maati et al., 2012).

Hiperpolarisasi yang diinduksi oleh MLC901 karena aktivasi kanal K_{ATP} , terutama pada neuron yang menderita kekurangan energi, untuk waktu yang singkat mencegah pelepasan besar-besaran dari eksitotoksik glutamat. Selain aktivasi kanal K_{ATP} sebagai peristiwa kunci dalam efek pelindung saraf MLC901, percobaan *in vivo* telah menunjukkan bahwa pengobatan MLC901 (pada model

iskemia global) mengaktifkan serine/treonine kinase Akt di daerah otak yang rentan, yang merupakan mediator sentral dalam jalur transduksi sinyal yang terlibat dalam kelangsungan hidup sel setelah iskemia serebral (Heurteaux et al., 2013; Moha Ou Maati et al., 2012).

Efek terapeutik positif MLC901 juga dikaitkan dengan penurunan tingkat protein Bax, yang merupakan molekul proapoptosis yang kuat, anggota keluarga Bcl-2 yang memicu aktivasi caspase terminal. Hal ini sejalan dengan pengurangan *TUNEL labeling* (penanda degradasi DNA) yang menunjukkan bahwa neuroproteksi yang diinduksi oleh MLC901 melibatkan penurunan jalur apoptosis. (Heurteaux et al., 2013; Quintard et al., 2011).

Pengurangan radikal bebas di jaringan iskemik telah lama dianggap sebagai salah satu strategi pelindung saraf potensial untuk membatasi luasnya kerusakan jaringan otak setelah iskemia. Tingkat peroksidasi yang disebabkan oleh pelepasan radikal bebas di hipokampus hewan yang mengalami iskemia global, yang dinilai berdasarkan kadar MDA, metabolit stabil dari kaskade peroksidasi lipid dan indikator status oksidasi seluler, mengalami peningkatan. Tetapi produksi MDA yang diinduksi iskemia ini secara drastis menurun dengan pengobatan MLC901. Hasil ini menunjukkan bahwa MLC901 juga mengandung zat aktif sebagai antioksidan (Heurteaux et al., 2013).



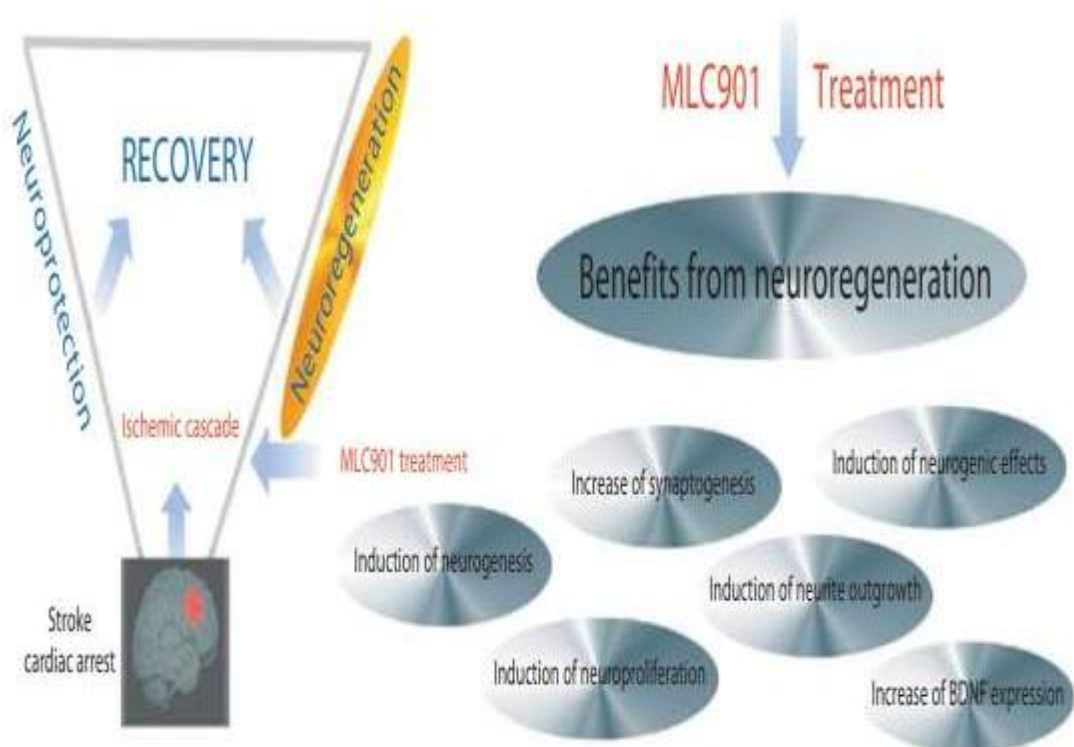
Gambar 2.11 Efek Neuroproteksi MLC901
 Sumber: Heurteaux et al., 2013

2.2.2 Efek Neuroregenerasi

Pemulihan dari kerusakan jaringan otak bergantung pada stimulasi proses neuroregenerasi yang efektif. Oleh karena itu, pertanyaan penting adalah apakah MLC901 merangsang neuroplastisitas dan neurogenesis, sehingga berkontribusi pada pemulihan fungsi otak yang optimal. Sekarang telah diketahui dengan baik bahwa setelah iskemia, otak menggunakan komplemen dari respon neuroplastisitas untuk mengatur kembali, setidaknya sebagian, peta kortikal. Perubahan dalam organisasi kortikal juga mencakup peningkatan jumlah dan kepadatan dendrit dan sinapsis. Harteux dan rekan telah menunjukkan bahwa MLC901 mampu meningkatkan neurogenesis basal. Pemberian MLC901 dalam air minum selama 6 minggu meningkatkan 2 kali lipat jumlah sel *newborn* yang berdiferensiasi menjadi neuron dewasa dalam 3 minggu. MLC901 juga telah

terbukti merangsang neurogenesis di zona subgranular dari gyrus dentatus tikus yang mengalami iskemia global. Pengobatan MLC901 yang diberikan 3 jam setelah iskemia diikuti dengan 1 injeksi per hari selama 7 hari setelah reperfusi sangat meningkatkan peningkatan jumlah prekursor saraf BrdU-positif setelah iskemia dibandingkan dengan hewan *vehicle*. Selain itu, proses neurogenik yang diinduksi MLC901 pada neuron kortikal juga telah diamati pada stem sel embrionik manusia. MLC901 terbukti memiliki efek positif pada jumlah progenitor neuron yang berasal dari stem sel embrionik manusia. Semua pengamatan tersebut menunjukkan bahwa MLC901 mengandung molekul kunci yang mampu menciptakan lingkungan mikro yang baik untuk mendorong amplifikasi dan diferensiasi progenitor neuron. Eksperimen *in vitro* pada kultur sel kortikal telah menunjukkan bahwa MLC901 membantu mengembangkan arborisasi aksonal dan dendritik yang padat, yang diilustrasikan oleh peningkatan besar intensitas pelabelan fluoresen *doublecortin* serta hasil neurit yang ditingkatkan (Heurteaux et al., 2013)

Neuron kortikal yang diobati dengan MLC901 mengembangkan jaringan neuritik yang lebih padat dengan neurit dan percabangan yang lebih sering memanjang, menghasilkan peningkatan ekspresi protein terkait pertumbuhan GAP43 di neurit. Efek neuroregeneratif MLC901 ini berkorelasi dengan peningkatan sinaptogenesis, yang divisualisasikan dengan peningkatan ekspresi sinaptotagmin-1, salah satu protein vesikel sinaptik yang memiliki peran penting dalam fungsi sinaptogenesis dan sinaps. Semua hasil ini sangat menyimpulkan bahwa MLC901, dengan kemampuannya untuk mempromosikan neurogenesis, perkembangan neurit dan sinaptogenesis, memiliki potensi untuk memperkuat sifat-sifat otak intrinsik untuk neuroplastisitas, mendukung pemulihan neurologis setelah iskemia (Heurteaux et al., 2013).



Gambar 2.12 Efek Neuroproteksi MLC901

Sumber: Heurteaux et al., 2013

Salah satu mekanisme yang mungkin dari efek MLC901 yang dijelaskan sebelumnya termasuk kemampuannya untuk merangsang sekresi BDNF yang merupakan faktor pertumbuhan penting yang mengatur kelangsungan hidup saraf dan plastisitas otak. Data *in vitro* menunjukkan bahwa pengobatan MLC901 selama 6 minggu (6 mg/ml) meningkatkan ekspresi BDNF di neuron kortikal (Heurteaux et al., 2010, 2013).

Pada penelitian terbaru oleh Gandin dan rekan terhadap efek menguntungkan dari MLC901. Menyimpulkan bahwa, MLC901 juga mendorong angiogenesis pada kondisi oklusi arteri cerebri media dengan memodulasi ekspresi faktor terkait angiogenesis seperti Hif1 α , EPO, VEGF dan Ang1/Ang2. Faktor tersebut diketahui tidak hanya memediasi proliferasi sel endotel, tetapi juga mengatur diferensiasi, regresi, dan permeabilitas vaskular (Gandin et al., 2016).

2.3 **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**

Vascular endothelial growth factor (VEGF) adalah sinyal utama dalam induksi pertumbuhan pembuluh darah, proses yang disebut angiogenesis. Meskipun studi pada satu dekade lalu, menunjukkan bahwa VEGF adalah faktor spesifik sel endotel, temuan yang lebih baru mengungkapkan bahwa VEGF juga memiliki efek langsung pada sel neuron. Studi genetik menunjukkan bahwa tikus dengan penurunan kadar VEGF mengalami degenerasi neuron motorik mengingatkan pada gangguan neurodegeneratif manusia *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (ALS). Studi genetik tambahan menegaskan bahwa VEGF adalah modifier dari degenerasi neuron motorik pada manusia dan pada tikus SOD^{1G93A} — model ALS. Penurunan kadar VEGF dapat meningkatkan degenerasi neuron motorik dengan membatasi perfusi jaringan saraf dan neuroproteksi yang bergantung pada VEGF. VEGF juga berefek pada kematian neuron setelah akut iskemik pada otak dan korda spinalis, dan juga terlibat dalam gangguan neurologis lain seperti neuropati diabetes dan iskemik neuropati, regenerasi saraf, penyakit Parkinson, penyakit Alzheimer, dan sklerosis multipel. Temuan ini telah meningkatkan minat dalam menilai potensi terapeutik VEGF untuk gangguan neurodegeneratif (Li et al., 2017; Storkebaum et al., 2004).

VEGF merupakan mitogen yang disekresikan dan terkait dengan angiogenesis dengan mengikat *reseptor tyrosine kinase* VEGFR-1 (Flt-1) dan VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Beberapa studi mengindikasikan VEGFR-2 mentransmisi kritikal angiogenesis sinyal sebagai respons terhadap VEGF. Isoform VEGF seperti 121, 165, 189 terdeteksi pada manusia dan 120, 164, 188 pada tikus. Meskipun isoform VEGF memainkan peran penting dalam pengembangan jaringan vaskular, ia bekerja secara independen pada neuron untuk memandu neurogenesis, pertumbuhan akson, plastisitas sinaps dan pola dendrit. VEGF mempertahankan neuron motorik dari kerusakan radikal bebas, hipoksia/hipoglikemia, eksitotoksitas glutamat sehingga memainkan peran penting pada penyembuhan cedera korda spinalis (Storkebaum et al., 2004; Wang et al., 2015).

Neuropilin-1 (NP-1) adalah reseptor spesifik untuk isoform VEGF₁₆₅ dan ko-reseptor dari VEGFR-2. NP-1 juga berikatan dengan *semaphorin3A* (Sema3A), sebuah *neurorepellent* yang terlibat dalam panduan akson. *Neuropilin-2* (NP-2) mengikat VEGF₁₆₅ dan VEGF₁₄₅, serta Sema3C dan

Sema3F. Fakta bahwa NP-1 dan NP-2 mengikat *semaphorins* dan VEGF menunjukkan bahwa reseptor ini memiliki peran baik dalam sistem saraf dan kardiovaskular. VEGFR-1 memiliki efek positif dan negatif. Dalam embrio, domain pengikat ligan ekstraseluler yang larut dari VEGFR-1 menjebak VEGF dan dengan demikian mengurangi angiogenesis yang dihasilkan oleh VEGFR-2. Dalam kondisi patologis, aktivasi VEGFR-1 oleh *Placental Growth Factor* (PGF), bentuk homolog lain dari VEGF, merangsang pertumbuhan dan pematangan pembuluh darah baru melalui pensinyalan langsung melalui VEGFR-1 dan *cross talk* antara reseptor VEGF (Storkebaum et al., 2004).

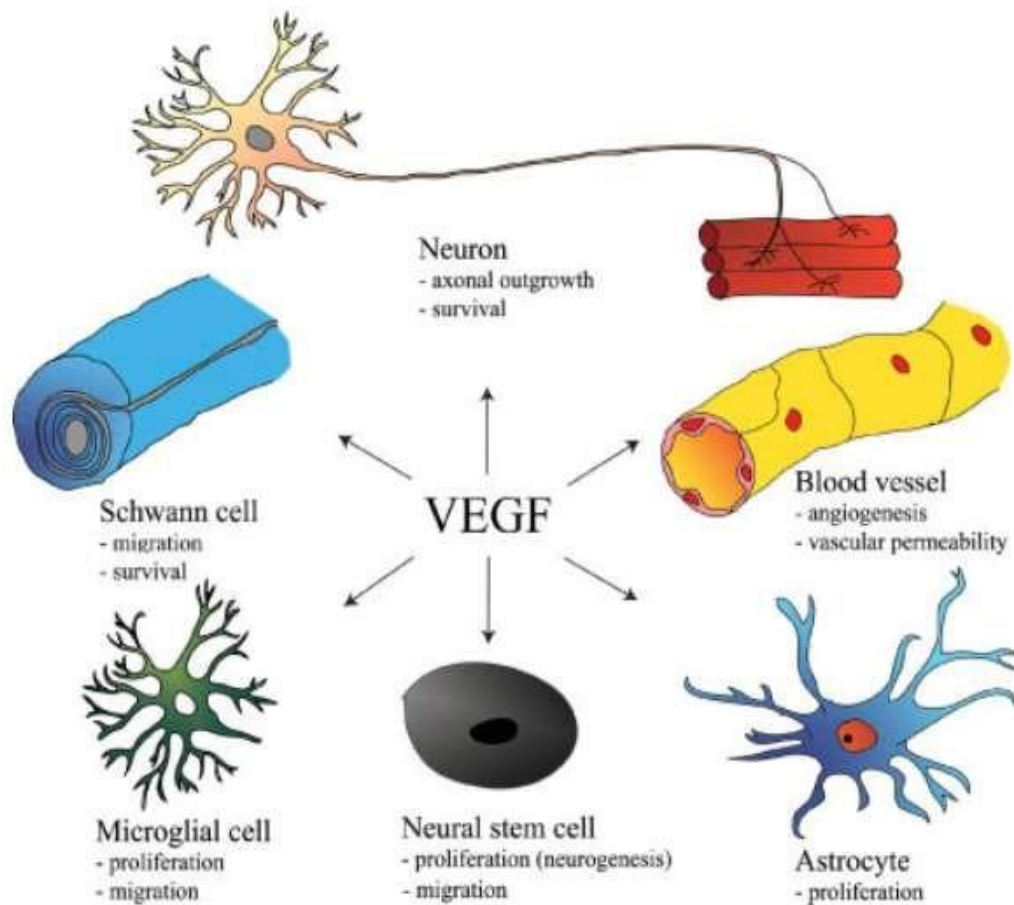
VEGF-A berikatan dengan VEGFR-1, VEGFR-2, NRP-1 dan NRP-2. VEGF-B dan PGF berikatan dengan VEGFR-1. VEGF-C dan VEGF-D mengikat VEGFR-2 dan VEGFR-3. Pensinyalan dari reseptor tersebut akan mengarah ke angiogenesis, vaskulogenesis, limfanogiogenesis, permeabilitas vaskular, kelangsungan hidup sel melalui penghambatan apoptosis, migrasi, proliferasi, dan mobilisasi progenitor. Sel neuron lebih banyak mengekspresikan VEGFR-2 sedangkan VEGFR-1 lebih banyak ditemukan pada sel glial (Xm & Mj, 2018).

2.3.1 Efek VEGF Pada Sel Neuron

VEGF pernah dianggap sebagai faktor pertumbuhan paling spesifik pada endotel, tetapi bukti terbaru menunjukkan bahwa VEGF juga memiliki efek langsung pada jenis sel saraf. Pada kultur dorsal root ganglia VEGF merangsang pertumbuhan aksonal dan meningkatkan kelangsungan hidup neuron dan sel satelit, sedangkan penghambatan sinyal VEGFR-2 menghalangi pertumbuhan aksonal sebagai respons terhadap VEGF. VEGF juga memiliki efek neurotropik pada kultur neuron dari sistem saraf pusat dan pada banyak kasus, VEGF memberikan efek ini melalui pensinyalan melalui VEGFR-2, PI3-kinase dan Akt. Pada kultur mesensefalon, VEGF meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup neuron dopaminergik dan astrosit. Pemberian sinyal melalui VEGFR-2, PI3-kinase dan Akt melindungi sel HN33 (fusi sel somatik dari neuron hipokampus dan sel neuroblastoma) terhadap kematian yang disebabkan oleh kekurangan oksigen dan glukosa (Storkebaum et al., 2004)

Pensinyalan VEGFR-2 melalui PI3-kinase/Akt dan MEK/ERK juga melindungi neuron hipokampus yang dikultur terhadap toksisitas yang diinduksi glutamat atau cedera hipoksia, mungkin melalui penghambatan proses

eksitotoksik, dan menstimulasi kelangsungan hidup neuron granula serebelar setelah prekondisi hipoksia. Pensinyalan VEGF/VEGFR-2 juga melindungi kultur neuron kortikal yang mengalami hipoksia. VEGF merangsang kelangsungan hidup neuron melalui regulasi arus Ca^{2+} , tetapi efek ini bergantung pada pensinyalan melalui VEGFR-1, bukan melalui VEGFR-2. Memang, dalam sel neuroblastoma SH-SY5Y, hipoksia dan deprivasi glukosa mengatur tingkat VEGF dan saluran K^+ dengan gerbang tegangan Kv1.2 dan juga meningkatkan *tyrosine phosphorylation* dari saluran ion ini. Penambahan VEGF eksogen dalam kondisi ini meningkatkan kelangsungan hidup sel dan fosforilasi tirosin Kv1.2, sedangkan penghambatan VEGF memiliki efek berlawanan. Dengan demikian, VEGF memiliki efek neurotropik *in vitro* langsung pada beberapa jenis sel saraf, termasuk neuron otonom, sensorik, dopaminergik, hipokampus, serebelar, dan kortikal. Selain efeknya pada neuron yang dibedakan, VEGF menstimulasi neurogenesis *in vitro* dan *in vivo*. Misalnya, VEGF merangsang proliferasi prekursor neuron dalam kultur *cortex cerebri*, dan infus intracerebroventricular terus menerus dari VEGF merangsang penggabungan BrdU di otak tikus, baik zona subventrikular dan subgranular dari girus dentate hipokampus (Storkebaum et al., 2004). Efek neuroproliferatif *in vitro* dari VEGF dimediasi melalui VEGFR-2 dan peningkatan regulasi dari *E2F family transcription factors*, konsisten dengan regulasi transisi fase G1-S dari siklus sel. VEGF juga meningkatkan kelangsungan hidup stem sel neuron yang dikultur dalam kondisi anoksik dan merupakan *chemoattractant progenitor neuron* yang distimulasi *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2). Secara khusus, FGF-2 menginduksi ekspresi VEGFR-1 dan VEGFR-2 pada neural progenitors, dan pensinyalan melalui VEGFR-2 memediasi efek *chemotactic* dari VEGF. Secara keseluruhan, VEGF memiliki efek neurotropik langsung *in vitro*, terutama dimediasi oleh VEGFR-2 (Storkebaum et al., 2004).

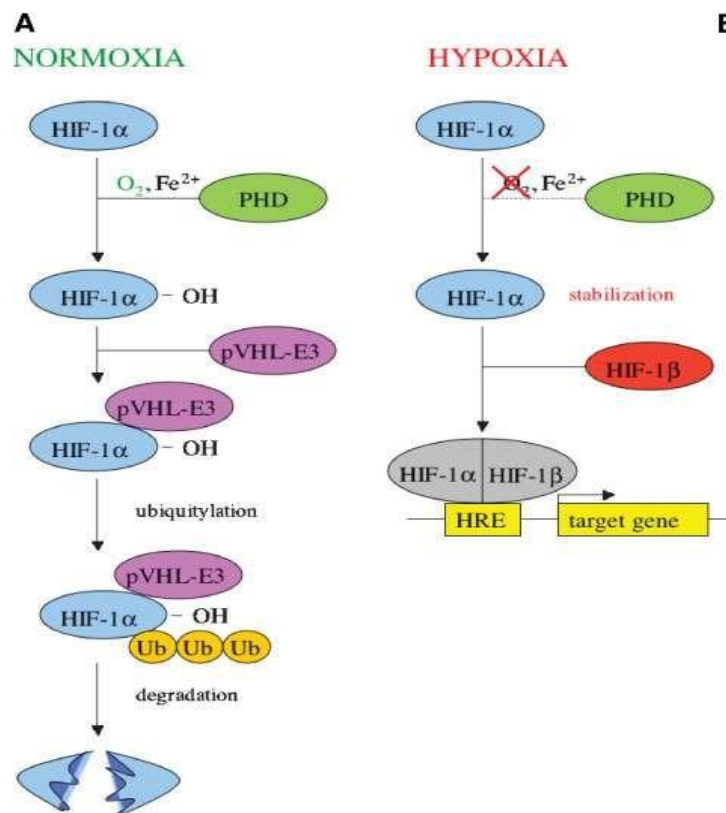


Gambar 2.13 Efek *pleiotropic* dari VEGF
 Sumber: Storkebaum et al., 2004

2.3.2 Regulasi VEGF

Peningkatan kadar protein VEGF dalam kondisi hipoksia disebabkan oleh kontrol pada tingkat transkripsi dan translasi. *Hypoxia-inducible transcription factors* (HIF) mengikat *Hypoxia-response element* (HRE) pada promotor VEGF dan dengan demikian meningkatkan transkripsi VEGF pada keadaan hipoksia. Hidroksilasi HIF-1 α oleh *proline hydroxylase domain-containing proteins* (PHD) menargetkan degradasi HIF-1 α oleh jalur proteasome di normoksia. Dalam hipoksia, PHD tidak lagi dapat menghidroksilasi HIF-1 α dan tingkat protein HIF-1 α distabilkan, memungkinkan faktor transkripsi ini dimerisasi dengan HIF-1 β dan meningkatkan transkripsi dari gen VEGF. Hipoksia juga mempengaruhi stabilitas mRNA VEGF dengan mengatur pengikatan HuR mRNA binding protein dan faktor-faktor lain ke urutan spesifik di 3' *untranslated region* (UTR). Mekanisme

lain dari induksi hipoksia VEGF melibatkan regulasi dari *Internal Ribosome Entry Site* (IRES), terletak di 5' UTR dari mRNA VEGF (Storkebaum et al., 2004).



Gambar 2.14 HIF-1 α pada keadaan normoksia dan hipoksia
Sumber: Storkebaum et al., 2004

Pada kondisi normoksia, HIF-1 α di hidrosilasi oleh PHD, proses tersebut membutuhkan O₂ sebagai kosubstrat dan besi sebagai kofaktor. Hidrosilasi HIF-1 α memungkinkan interaksi antara HIF-1 α dan *tumor suppressor von Hippel-Lindau kigase complex E3* (pVHL-E3). Hasil interaksi ini adalah *ubiquitylation* dari HIF-1 α dan degradasi oleh jalur proteasome. B: Dalam kondisi hipoksia, PHD tidak dapat menghidrosilasi HIF-1 α , karena kekurangan O₂. Akibatnya, interaksi antara HIF-1 α dan pVHL tidak dapat terjadi dan HIF-1 α distabilkan. Hal ini memungkinkan HIF-1 α memasuki nukleus, dimerisasi dengan HIF-1 β dan meningkatkan transkripsi VEGF dan gen responsif hipoksia lainnya (Storkebaum et al., 2004).

2.3.3 Perubahan level VEGF dan Ekspresi Reseptor VEGF Setelah Cedera Korda Spinalis

Bartholdi dkk. dan Herrera et al. mengamati penurunan kadar VEGF di episenter cedera pada 1 hari pasca cedera korda spinalis dengan penurunan kadar VEGF selama 1 bulan pasca cedera korda spinalis. Selain itu, Ritz et al. melaporkan penurunan tingkat VEGF, Angiopoietin-1 (Ang-1), PDGF-BB, dan PGF, dan peningkatan ekspresi faktor pertumbuhan hepatosit faktor angiogenik. Reseptor VEGF Flt-1 dan Flk-1 telah terbukti diekspresikan secara konstitutif oleh sel endotel vaskular, neuron, dan beberapa astrosit di korda spinalis. Setelah cedera korda spinalis, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR2 (Flk-1) dan reseptor neuropilin-1 telah terbukti diregulasi dalam astrosit reaktif dan mikroglia/makrofag setelah cedera korda spinalis kontusif. Ekspresi reseptor ini memuncak antara 7 dan 14 hari setelah cedera dan tetap relatif tinggi bahkan pada 14 hari dan seterusnya. Secara keseluruhan, ini menunjukkan bahwa VEGF dan dua reseptor tirosin kinase berperan dalam inflamasi dan respons astrositik setelah cedera korda spinalis` kontusif. Namun, Skold et al. studi *in vitro* menunjukkan bahwa upregulasi VEGF, reseptor dan ko-reseptornya di astrosit dapat terjadi tanpa adanya sel inflamasi, dengan prostaglandin menjadi bagian hulu dari VEGF (Xm & Mj, 2018).

2.4 *Neuron Specific Enolase (NSE)*

Enolase adalah enzim glikolitik multifungsi yang bertindak sebagai protein pengikat plasminogen dan ditemukan terlibat dalam keadaan hipoksia dan iskemia. *Enolase* memainkan banyak peran dalam kontrol pertumbuhan, aktivasi kekebalan, peradangan, dan respons alergi. Ekspresi permukaan sel dari enolase sering terdeteksi pada monosit/ makrofag yang teraktivasi, mikroglia, dan astrosit, yang mendorong degradasi matriks ekstraseluler (ECM), produksi sitokin/kemokin proinflamasi, dan invasi sel inflamasi di lokasi cedera. Setelah aktivasi, enolase juga dapat bertindak sebagai *heat-shock protein* dengan mengikat struktur sitoskeletal dan kromatin, dan mungkin memainkan peran penting dalam berbagai cedera, dan proses patofisiologis. Studi terbaru menunjukkan bahwa NSE, memiliki potensi berguna sebagai biomarker untuk

menilai kerusakan neuron dan prognosis dari cedera otak. NSE dapat diperiksa pada darah dan cairan serebrospinalis. Konsentrasi tinggi NSE telah di deteksi di *gray matter* pada otak dewasa, sementara level rendah dari NSE di laporkan terdapat pada *white matter*.

NSE memiliki implikasi pada kondisi iskemia, hipoksia, dan beragam penyakit metabolik, proliferaatif, inflamasi, autoimun, dan neurodegeneratif. Hilangnya neuron dan koneksi sinaptik secara bertahap adalah gambaran umum dari gangguan neurodegeneratif, di mana tingkat kehilangan saraf berkorelasi dengan peningkatan kadar NSE dalam serum dan CSF dan perkembangan klinis penyakit. Studi terbaru menunjukkan peran inflamasi untuk NSE pada cedera korda spinalis, kondisi dengan perubahan patologis progresif yang mencakup kaskade molekuler yang kompleks dan berkembang. Tingkat ekspresi NSE di jaringan yang berbeda setelah cedera korda spinalis pada tikus ditemukan meningkat secara signifikan setelah cedera korda spinalis akut dan penghambatan ekspresi dan aktivitas NSE menurunkan cedera sekunder pada korda spinalis. Selain itu, penghambatan *enolase*/NSE telah terbukti mengurangi kemokin/sitokin inflamasi, menghambat aktivasi MMP-9, memodulasi hormon metabolik, dan mengurangi gliosis setelah cedera korda spinalis melalui jalur seluler dan metabolik yang berbeda. Namun, peran spesifik NSE dalam kondisi inflamasi setelah cedera korda spinalis dan mekanisme di mana tingkat NSE yang tinggi dapat mempengaruhi neurodegenerasi pada cedera korda spinalis, masih belum jelas.

Sementara peran spesifiknya dalam proses inflamasi masih belum jelas, NSE dianggap sebagai biomarker pada stres neuron dan memiliki potensi prognostik untuk berbagai gangguan neurologis. Kadar NSE serum meningkat secara signifikan pada pasien dengan hasil neurologis yang buruk dalam berbagai kondisi. Selain itu, tingkat kecacatan dan defisit neurologis sering berkorelasi dengan peningkatan konsentrasi NSE, yang menunjukkan nilai prognostiknya. Peningkatan NSE dianggap sebagai penanda kerusakan oksidatif dan merupakan parameter yang mendasari beberapa gangguan neurodegeneratif, termasuk penyakit Huntington, ataksia Friedreich, paraplegia spastik hereditas, bentuk familial yang langka dari penyakit parkinson, penyakit Alzheimer, dan *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (ALS). Dalam penelitian terbaru, konsentrasi serum NSE diukur pada pasien dengan serangan jantung dari lima rumah sakit di Jerman, Austria, dan Italia, dan hasilnya dianalisis. Konsentrasi

serum NSE yang tinggi memprediksi hasil neurologis yang buruk pada sebagian besar pasien henti jantung. Level NSE juga telah digunakan untuk memprediksi hasil neurologis pada cedera otak traumatis dan penyakit retinal, seperti ablasi retinal. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa NSE serum memiliki nilai prediksi yang tinggi untuk menentukan tingkat keparahan dan hasil *neurobehavioral* awal setelah stroke akut dan kejadian neurologis merugikan lainnya. Nilai serum NSE ditemukan relatif rendah pada awal cedera otak iskemik dan dapat meningkat lebih tinggi pada pasien dengan hasil yang tidak diinginkan dibandingkan pada pasien dengan hasil yang menguntungkan bahkan setelah 6 bulan. Kadar NSE yang meningkat juga terdeteksi pada subjek diabetes, dan kadar NSE yang lebih tinggi berkaitan erat dengan neuropati diabetik.

Selain mengevaluasi serum untuk biomarker kerusakan saraf, sejumlah penelitian bertujuan untuk memvalidasi biomarker plasma untuk kerusakan saraf yang dapat digunakan dalam model penyakit saraf akut dan kronis. Plasma NSE adalah biomarker eksperimental yang valid dan sederhana yang memungkinkan untuk mengukur derajat cedera saraf dalam pendekatan non-invasif. Konsentrasi NSE plasma yang lebih tinggi dikaitkan dengan kematian pada pasien sepsis yang kritis, menunjukkan bahwa NSE mungkin memiliki kegunaan sebagai penanda cedera saraf pada sepsis. Kadar NSE plasma meningkat dalam berbagai kondisi kerusakan SSP. NSE meningkat pada beberapa jenis kanker, trauma kepala, kerusakan otak setelah operasi jantung, dan infark serebral. Dengan demikian, NSE memiliki potensi diagnostik dan prognostik untuk inflamasi dan kerusakan saraf pada masing-masing kondisi ini (Haque et al., 2016, 2017, 2018; Polcyn et al., 2017).

2.5 Fungsi Lokomotor

Analisis yang paling umum digunakan pada pemulihan lokomotor pada hewan pengerat diukur di lapangan terbuka dan dinilai menggunakan skor *Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) locomotor rating score*. Skor BBB, yang diperkenalkan pada tahun 1995, telah menetapkan transparansi, validitas prediktif, dan sensitivitas untuk mengukur pemulihan alat gerak setelah kontusio cedera inkomplit korda spinalis. Kelebihan dari skor ini adalah terdapat sistem penilaian tunggal yang dapat digunakan untuk membandingkan pergerakan

normal dengan gangguan yang paling parah. Ciri unik lain dari BBB, berada pada definisi operasional yang memberikan bahasa universal antar peneliti pada analisis fungsi lokomotor. Ini secara efektif meningkatkan transparansi penelitian cedera korda spinalis, memungkinkan satu peneliti untuk dengan mudah memahami sistem penilaian yang lain. Penting untuk tetap menggunakan bahasa yang sama untuk meningkatkan transparansi dari pada terus merancang pengujian baru (Fouad et al., 2020).

Basso, Beattie, and Bresnahan Locomotor Rating Scale

0	No observable hindlimb (HL) movement
1	Slight movement of one or two joints, usually the hip and/or knee
2	Extensive movement of one joint or extensive movement of one joint <i>and</i> slight movement of one other joint
3	Extensive movement of two joints
4	Slight movement of all three joints of the HL
5	Slight movement of two joints <i>and</i> extensive movement of the third
6	Extensive movement of two joints <i>and</i> slight movement of the third
7	Extensive movement of all three joints of the HL
8	Sweeping with no weight support or plantar placement of the paw with no weight support
9	Plantar placement of the paw with weight support in stance only (i.e., when stationary) or occasional, frequent, or consistent weight-supported dorsal stepping and no plantar stepping
10	Occasional weight-supported plantar steps; no FL-HL coordination
11	Frequent to consistent weight-supported plantar steps <i>and</i> no FL-HL coordination
12	Frequent to consistent weight-supported plantar steps <i>and</i> occasional FL-HL coordination
13	Frequent to consistent weight-supported plantar steps <i>and</i> frequent FL-HL coordination
14	Consistent weight-supported plantar steps, consistent FL-HL coordination, <i>and</i> predominant paw position during locomotion is rotated (internally or externally) when it makes <i>initial contact</i> with the surface as well as just before it is <i>lifted off</i> at the end of stance; or frequent plantar stepping, consistent FL-HL coordination, and occasional dorsal stepping
15	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination <i>and</i> no toe clearance or occasional toe clearance during forward limb advancement; predominant paw position is parallel to the body at initial contact
16	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait <i>and</i> toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
17	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait <i>and</i> toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact <i>and</i> lift off
18	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait <i>and</i> toe clearance occurs consistently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift off
19	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait, toe clearance occurs consistently during forward limb advancement, predominant paw position is parallel at initial contact <i>and</i> lift off, and tail is down part or all of the time
20	Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel at initial contact and lift off, <i>and</i> trunk instability; tail consistently up
21	Consistent plantar stepping and coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel throughout stance, and consistent trunk stability; tail consistently up

Note. Slight: Partial joint movement through less than half the range of joint motion. Extensive: Movement through more than half of the range of joint motion. Sweeping: Rhythmic movement of HL in which all three joints are extended and then fully flex and extend again; animal is usually sidelying and plantar surface of paw may or may not contact the ground; no weight support across the HL is evident. No weight support: No contraction of the extensor muscles of the HL during plantar placement of the paw; or no elevation of the hindquarter. Weight support: Contraction of the extensor muscles of the HL during plantar placement of the paw; or, elevation of the hindquarter. Plantar stepping: The paw is in *plantar* contact with weight support and then the HL is advanced forward and *plantar* contact with weight support is reestablished. Dorsal stepping: Weight is supported through the dorsal surface of the paw at some point in the step cycle. FL-HL coordination: For every FL step a HL step is taken and the HLs alternate. Occasional: Less than or equal to half; $\leq 50\%$. Frequent: More than half but not always; 51–94%. Consistent: Nearly always or always; 95–100%. Trunk instability: Lateral weight shifts which cause waddling from side to side or a partial collapse of the trunk.

Gambar 2.15 Tabel penilaian skor BBB

Dalam paradigma standar BBB, hewan terlebih dahulu dilatih untuk bergerak di lapangan terbuka yang terdiri dari kolam plastik berdiameter sekitar 90 cm dengan dinding setinggi 7-10 cm. Dua pemeriksa independen mempelajari kemampuan lokomotor subjek tes selama kurang lebih 4 menit berturut-turut, dan menilai pergerakan subjek menggunakan skala 21 poin. Setelah intervensi bedah atau kimiawi, tikus kemudian diuji mulai 1 hari pasca perawatan, dengan

pengujian berulang secara rutin hingga 6–9 minggu pasca perawatan. Biasanya hewan yang terluka diuji hanya sekali seminggu. Skala lokomotor BBB memiliki jangkauan yang sangat luas yang terdiri dari tidak ada gerakan kaki belakang yang dapat diamati (skor BBB 0), langkah kaki plantar yang konsisten dan gerakan anggota tubuh yang terkoordinasi, jarak jari kaki yang konsisten, posisi kaki paralel sepanjang siklus langkah, konsisten stabilitas tubuh, dan ekor konsisten bergerak keatas (skor BBB 21). Skema peringkat ini adalah skala ordinal, selain itu subjek tidak dapat memiliki skor kurang dari nol atau lebih tinggi dari 21. Skala ini juga memiliki properti bahwa interval antara skor tidak seragam, sehingga kemajuan selama bagian tertentu dari skala dapat terjadi dengan sangat cepat. Penting juga untuk mempertimbangkan fakta bahwa hewan yang menunjukkan skor BBB 6 tidak dua kali lebih buruk dari hewan dengan skor 12, dan banyak hewan yang mampu menunjukkan peningkatan beberapa tingkat BBB dalam 2 minggu pertama setelah cedera korda spinalis (Scheff et al., 2002).

2.6 Model Cedera Korda Spinalis pada Hewan Coba (Tikus *Sprague-Dawley*)

Saat ini untuk memilih model hewan, beberapa faktor dipertimbangkan tergantung pada tujuan penelitian yang diusulkan. Transeksi dan kontusio medulla spinalis adalah metode yang paling umum digunakan untuk pemodelan hewan cedera korda spinalis. Sementara model transeksi memberikan situasi yang ideal untuk mempelajari regenerasi sumsum tulang belakang pada lesi komplis, tetapi sumsum tulang belakang yang ditranseksi jarang ditemui pada cedera korda spinalis manusia. Dengan kata lain, pada sebagian besar cedera korda spinalis tetap terjadi kontinuitas jaringan di seluruh area cedera. Sehingga model kontusio dan kompresi lebih relevan secara klinis. Model-model ini dapat membuat cedera bergradasi dan ditandai dengan nekrosis hemoragik, iskemia, peradangan, dan kavitas sentral. Selain itu, model kompresi berkontribusi untuk mensimulasikan oklusi persisten *canalis spinalis* yang umum terjadi pada cedera korda spinalis manusia (Sharif-Alhoseini & Rahimi-Movaghar, 2014).

Model kompresi berbeda dari model kontusio karena melibatkan kompresi korda spinalis yang berkepanjangan. Beberapa model ini, pada kenyataannya, merupakan model kontusio-kompresi yang melibatkan benturan akut diikuti

dengan kompresi korda spinalis yang terus-menerus. Mekanisme ini terlihat pada cedera korda spinalis karena dislokasi fraktur dan *burst fracture*. Cedera kompresi pada model hewan menghasilkan hasil yang serupa dengan yang ditemukan di cedera korda spinalis pada manusia misalnya yang disebabkan oleh kompresi tumor atau gaya tekan yang merugikan lainnya dan dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai alat sederhana. Cedera kontusio dan kompresi serupa karena keduanya merupakan gaya tekan dan keduanya memiliki fitur patologis yang serupa, seperti disorganisasi *cytoarchitectonic* dan menimbulkan respons endogen yang serupa terhadap cedera. Model cedera kontusio biasanya menerapkan *force* ke dorsal korda spinalis dengan menggunakan peralatan khusus dengan cara yang mirip dengan kasus cedera korda spinalis pada manusia akibat impaksi *spinal column*. Sebaliknya cedera kompresi dapat terjadi dengan berbagai metode yang menerapkan *force* secara dorsal atau lateral. Metode cedera kompresi termasuk forseps yang dikalibrasi, klip aneurisma atau menempatkan beban langsung ke sumsum tulang belakang. Keuntungan dari klip aneurisma adalah bahwa klip tersebut mampu memberikan jumlah *force* yang berbeda. Metode penambahan beban ke permukaan dorsal dari korda spinalis secara langsung membutuhkan pemberat yang ditempatkan selama 10 menit, hal ini secara drastis meningkatkan lamanya operasi dan mengakibatkan hasil yang tidak konsisten karena penempatan beban dan gerakan akibat respirasi hewan (Cheriyen et al., 2014; McDonough et al., 2015).

2.6.1 Anatomi Korda Spinalis Tikus

Korda Spinalis tikus merupakan struktur yang ramping, hampir silindris, dan sedikit pipih secara dorsoventral. Ini memanjang dari caudal *hindbrain* di foramen magnum hingga ke bagian bawah kolom vertebral. Bagian paling kaudal dari korda spinalis mencapai tingkat vertebra lumbalis keenam. Pada tikus, ada 25 hingga 30 tulang belakang antara kranium dan ujung ekor sakrum. Rumus pada tikus umumnya 7 serviks, 13 toraks, 6 lumbar, 4 sakral, dan 28 tulang ekor (Crisler et al., 2019; Sengul & Watson, 2012).

Bagian paling distal dari korda spinalis disebut *conus medullaris*. Ujung runcing dari *conus medullaris* berlanjut sebagai filamen ramping; *filum terminale*, yang terdiri dari jaringan fibrosa yang berasal dari *pia mater* dan ditutupi oleh

lanjutan dari arachnoid. Filum terminale menghubungkan ujung bawah medula spinalis dengan kolumna vertebralis. Karena ujung distal medula spinalis tidak mencapai ujung kanalis vertebralis, nervus spinalis daerah ini memanjang dan berjalan ke arah rostrokaudal. Karena itu, mereka berjalan agak jauh di dalam kanal vertebral. Bundel akar saraf di bawah conus medullaris dinamai cauda equina karena kemiripannya dengan ekor kuda. Karena medula spinalis secara keseluruhan lebih pendek dari kanalis vertebralis, hanya segmen medula spinalis paling rostral yang ditemukan berseberangan dengan vertebra yang sesuai, dan perbedaan tersebut meningkat dalam perkembangan *rostrocaudal* (Sengul & Watson, 2012).

Sumsum tulang belakang tikus terdiri dari 34 segmen: 8 serviks (C1 hingga C8), 13 toraks (T1 hingga T13), 6 lumbar (L1 hingga L6), 4 sakral (S1 hingga S4), dan 3 tulang ekor (Co1 hingga Co3). Ada dua pembesaran, pembesaran serviks dan lumbar (lumbosakral), yang melibatkan segmen yang menghubungkan saraf anggota badan. Pembesaran serviks (*intumescentia cervicalis*) memanjang dari C5 hingga T1, dan pembesaran lumbosakral (*intumescentia lumbalis*) memanjang dari L2 hingga L6. Pembesaran lumbosakral sedikit lebih sempit dari pembesaran serviks, dan diameter dorso-ventralnya juga sedikit lebih kecil. Segmen sumsum tulang belakang cenderung relatif pendek dalam pembesaran. Di bagian atas serviks dan di sumsum tulang belakang toraks, segmennya lebih memanjang. Pada tikus terdapat 15 *dorsal rootlets* dan 15 *ventral rootlets* di setiap sisi setiap segmen sumsum tulang belakang; *rootlets* bergabung untuk membentuk *dorsal roots* dan *ventral roots* dari setiap saraf korda spinalis (Sengul & Watson, 2012).

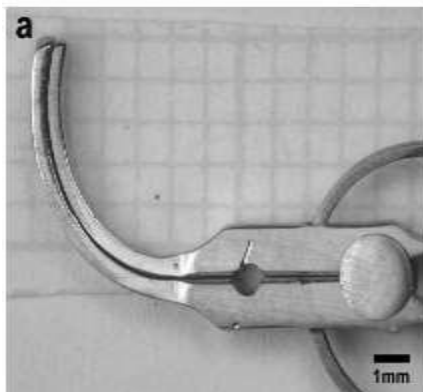
2.6.2 Level Cedera Korda Spinalis

Mayoritas cedera pada manusia yang dilaporkan terjadi pada tingkat *cervix*, seringkali sekunder akibat fraktur tulang belakang, menghasilkan kompresi atau kontusio dari korda spinalis. Defisit fungsional setelah cedera korda spinalis pada level *cervix* adalah akibat dari kerusakan *white matter* dan *grey matter*. Pada tingkat ini, gangguan *white matter* menyebabkan kelumpuhan spastik di bawah level cedera, kehilangan sensorik / nyeri kronis, kardiovaskular, gastrointestinal, dan disfungsi seksual. Neuron motorik yang mengendalikan otot-

otot ekstremitas atas berada di sana, dan kehilangannya menyebabkan *flaccid paralysis*. Namun sejauh ini, cedera korda spinalis level toraks adalah lokasi yang paling umum digunakan pada model hewan. Karena hilangnya *grey matter* pada tingkat korda spinalis ini menyebabkan hilangnya fungsi yang kurang dapat diidentifikasi, cedera korda spinalis level toraks juga dapat berkontribusi untuk mengisolasi dan mempelajari defisit *white matter*. Selain itu, tingkat cedera pada level *cervix* yang tinggi dapat menyebabkan disfungsi diafragma karena gangguan dorongan pernapasan bulbospinal ke motor neuron *nervus phrenicus* (C3-C5). Dengan demikian model cedera korda spinalis level toraks jelas dapat diandalkan dan mudah direproduksi (Sharif-Alhoseini & Rahimi-Movaghar, 2014).

2.6.3 Clip Compression

Penggunaan klip aneurisma yang telah dimodifikasi untuk menghasilkan cedera korda spinalis pada tikus pertama kali dijelaskan pada tahun 1978. Prosedur ini melibatkan tindakan laminektomi pada tingkat tulang belakang yang diinginkan. Klip ditutup pada kekuatan tertentu di sekitar korda spinalis sehingga terjadi cedera akut dan kemudian dibiarkan menekan korda spinalis untuk jangka waktu tertentu, biasanya selama minimal 1 menit untuk menyebabkan cedera. Ketika klip ditutup dengan cepat, kontusio pada korda spinalis dihasilkan oleh gaya kompresi yang diterapkan pada aspek dorsal dan ventral korda spinalis. *Force* dapat divariasikan berdasarkan pada kekuatan penutupan bilah klip, tergantung pada variasi karakteristik yang dipasang pada klip sehingga terdapat beberapa jenis klip yang dapat menghasilkan *force* yang bervariasi pada cedera korda spinalis. Selain itu, durasi penerapan klip juga dapat bervariasi untuk menghasilkan cedera dengan tingkat keparahan yang berbeda-beda (Cheriyon et al., 2014; Poon et al., 2007).



Gambar 2.16 Klip aneurisma yang telah dimodifikasi digunakan untuk membuat cedera pada korda spinalis

Sumber: Poon et al., 2007

Klip kompresi telah menjadi salah satu model yang paling sering digunakan pada cedera korda spinalis eksperimental, selain itu model klip kompresi pada korda spinalis adalah model yang murah dan konsisten untuk mempelajari cedera korda spinalis level toraks. Pada penelitian yang dilakukan oleh Poon dan rekan dengan menggunakan klip aneurisma yang telah dimodifikasi dengan *closing force* 20, 26, atau 35 g yang diaplikasikan secara ekstradural di sekitar korda spinalis pada level T₂, dan kemudian dilepaskan dengan cepat dengan kompresi korda spinalis yang berlangsung selama 1 menit didapatkan adanya hubungan respon-dosis antara tingkat keparahan cedera kompresi klip akut pada korda spinalis level torak dan fungsi lokomotor. Selain itu, terdapat juga hubungan respon-dosis antara tingkat keparahan kompresi klip akut pada korda spinalis level torak dan perubahan histopatologis pada korda spinalis (Poon et al., 2007).

Penggunaan klip kompresi pada model hewan memiliki kelebihan dan kekurangan sebagai berikut (Tator & Poon, 2009):

Kelebihan:

1. Murah
2. Tahan lama. Klip yang sama dapat digunakan untuk waktu yang tidak terbatas, meskipun kemampuan pegas akan melemah setelah beberapa kali bukaan dan penutupan.
3. Berguna untuk cedera pada semua level korda spinalis *cervix*, *thorax*, dan *lumbar*.
4. Berguna untuk model cedera akut, subakut dan kronis.
5. Berguna baik pada tikus maupun mencit.
6. Tidak membutuhkan pembukaan dura.

7. Menghasilkan kompresi anterior-posterior pada korda spinalis
8. Pelepasan cepat klip menghasilkan *impact* yang terjadi secara tiba-tiba.
9. Baik *force* dan durasi kompresi dapat diubah menjadi model cedera dengan tingkat keparahan rendah hingga tinggi, dan kurva dosis-respon yang andal dapat dihasilkan untuk *force* dan durasi kompresi.
10. Tidak diperlukan stabilisasi dan posisi yang tepat dari tulang belakang selama cedera.
11. Klip yang sama dapat dipasang dengan cincin yang berbeda untuk menghasilkan cedera dengan tingkat keparahan yang berbeda – beda.
12. Angka mortalitas dan morbiditas yang sangat rendah.

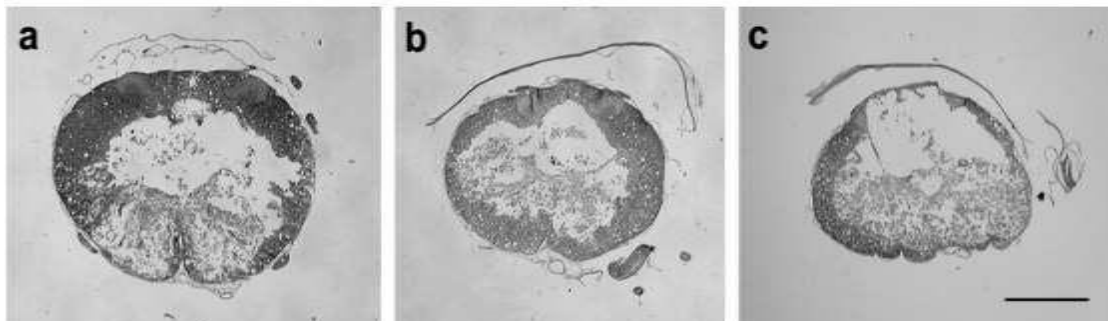
Kekurangan:

1. Setelah ratusan bukaan dan penutupan, pegas tempat gaya penjepit bergantung akan melemah. Karenanya, sebaiknya dilakukan kalibrasi gaya kompresi sebelum dan sesudah setiap percobaan.
2. Diperlukan latihan dan keahlian bedah untuk penempatan klip yang optimal dan konsisten di sekitar korda spinalis dengan trauma korda spinalis yang minimal.
3. Diperlukan tindakan laminektomi untuk penempatan klip.

2.6.4 Gambaran Histopatologis Berdasarkan Derajat *Clip Compression*

Poon et al, melakukan penelitian untuk menilai kerusakan pada korda spinalis model hewan tikus dengan menggunakan klip aneurisma yang telah dimodifikasi dengan *closing force* 20, 26, atau 35 g yang diaplikasikan secara ekstradural di sekitar korda spinalis pada level T₂. Kisaran kekuatan klip yang diterapkan (20 g hingga 35 g) dipilih untuk mewakili kisaran keparahan cedera yang terkait dengan cedera korda spinalis inkomplit pada manusia yang dinilai oleh *system American Spinal Injury Association* (ASIA) sebagai ASIA Grade B hingga D. Sedangkan pada klip kompresi korda spinalis pada level T₄ dengan

kekuatan 50 g pada tikus akan menghasilkan fitur klinis dan histologis dari cedera korda spinalis komplit, dengan ASIA Grade A pada manusia (Poon et al., 2007).



Gambar 2.17 Gambaran representatif korda spinalis yang diwarnai dengan LFB/hematoxylin dan eosin. Setelah *clip compression* dengan kekuatan : a, 20 g; b, 26 g; c, 35 g

Sumber: Poon et al., 2007

Pada penelitian tersebut menunjukkan terdapat kerusakan progresif dari jaringan dan peningkatan kavitas yang sesuai dengan peningkatan kekuatan dari *clip compression*. Kerusakan jaringan ditandai secara terpusat dan dibatasi dengan baik dari tepi jaringan yang bertahan di sekitarnya di ketiga kelompok. Jaringan yang bertahan sebagian besar adalah *white matter* dengan beberapa mielin yang diinfiltrasi dengan makrofag. Kelompok 20 g memiliki tepi paling tebal dari *white matter* yang *survive* dari perlakuan cedera, diikuti oleh kelompok 26 g dan kelompok 35 g yang hanya memiliki tepi tipis dari *white matter* yang tersisa (Poon et al., 2007).

Selanjutnya volume kavitas dan persentase kavitas sejalan lurus dengan kekuatan *clip compression*, dan persentase area jaringan normal yang tersisa di episentrum cedera menurun dengan kekuatan klip. Yang menariknya terdapat perbedaan yang signifikan diamati pada area jaringan total di episentrum cedera antara kelompok 35 g, yang secara signifikan lebih kecil, daripada kelompok 20 g dan 26 g (Poon et al., 2007).