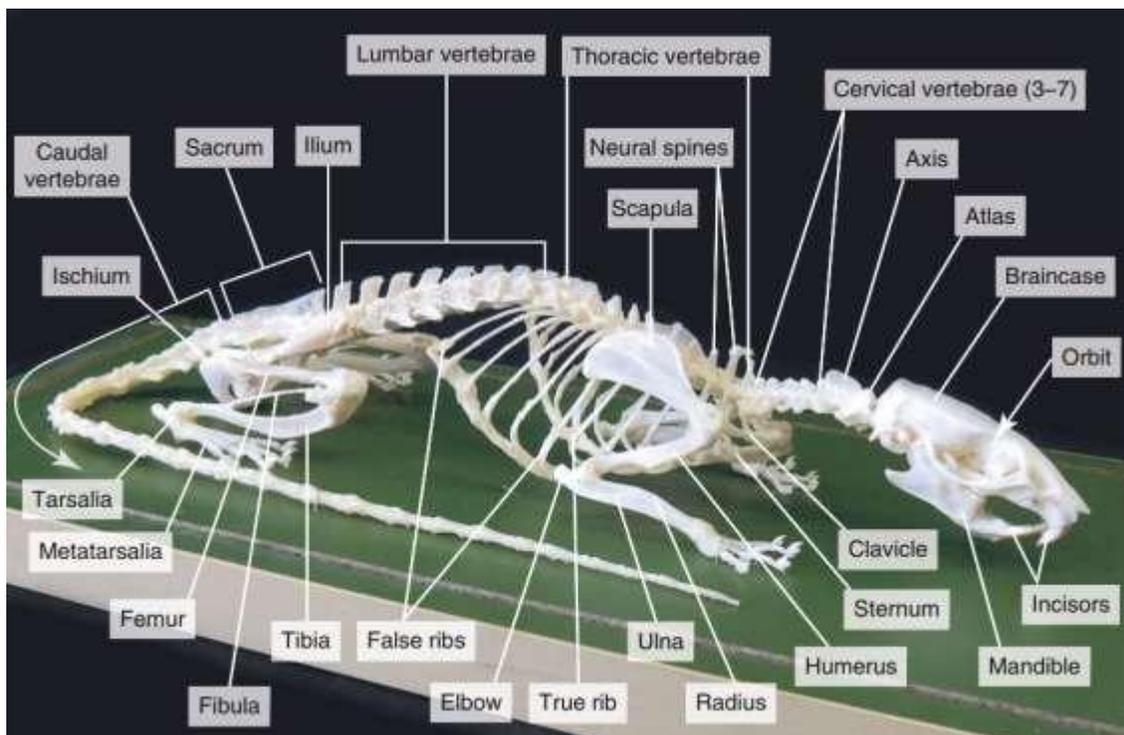


### 4.3 Definisi Operasional Variabel

1. Tikus adalah tikus *Sprague-Dawley* jantan, berat 250 g sampai dengan 300 g. Sampel diperoleh dari Laboratorium Animal bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.
2. *Laminectomy* adalah suatu tindakan untuk membuka lamina untuk mengekspose korda spinalis yang dilapisi duramater. Duramater akan dipisahkan dengan jaringan sekitarnya memakai disektor sebelum dilakukan penjepitan.
3. Cedera korda spinalis adalah trauma yang di berikan pada spinal cord pada level T2 dengan cara penjepitan dengan menggunakan *Aneurysma clip* yang sudah dimodifikasi kekuatan jepitnya. Cedera korda spinalis derajat berat akan terjadi setelah penjepitan dengan kekuatan 35 selama satu menit (Muhammad Faris, 2020; Poon et al., 2007).



**Gambar 4.2** Gambaran kerangka *Sprague Dawley*

Sumber: Lów et al., 2016

4. Intervensi MLC 901 adalah berisi 9 komponen herbal: 0,80 g *Radix astragali*, 0,16 g *Radix salvia miltiorrhizae*, 0,16 g *Radix paeoniae rubra*,

0,16 g *Rhizoma chuanxiong*, 0,16 g *Radix angelicae sinesis*, 0,16 g *Carthamus tinctorius*, 0,16 g *Prunus persica*, 0,16 g *Radix polygalae*, dan 0,16 g *Rhizoma acori tatarinowii*. MLC901 diencerkan dalam NaCl 0,9% pada konsentrasi 75 mg/ml dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C. Cairan solusinya kemudian disaring dengan filter 0,22- $\mu$ m, kemudian disuntikkan secara intraperitoneal dengan dosis tunggal MLC901 pada konsentrasi 0,075 mg/ml (dalam bolus 500  $\mu$ L) 2 jam setelah CKS diikuti dengan pemberian oral personele dengan dosis 68,4 mg/hari sampai hewan diterminasi (Quintard et al., 2011, 2014; Rosyidi et al., 2020).

5. Ekspresi mRNA Gen VEGF adalah ekspresi messenger RNA dari VEGF yang diukur dari serum hewan coba dan diperiksa dengan metode PCR.
6. Kadar VEGF serum diukur melalui darah perifer menggunakan pemeriksaan ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Pemeriksaan ELISA adalah uji serologis yang umum digunakan di berbagai laboratorium imunologi.
7. Kadar NSE serum diukur melalui darah perifer menggunakan pemeriksaan ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Pemeriksaan ELISA adalah uji serologis yang umum digunakan di berbagai laboratorium imunologi.
8. Pemeriksaan Histopatologis dengan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* (HE) pada korda spinalis tikus yang sudah dilakukan terminasi untuk melihat kerusakan jaringan dan cavitas yang timbul. Persentase kerusakan dan cavitas jaringan dihitung dengan komputerasi menggunakan aplikasi *Digmizer Image Analysis* versi 5.7.2
9. Fungsi lokomotor adalah pemeriksaan klinis kekuatan otot tikus dengan menggunakan Tes BBB (*Basso, Beattie, Bresnahan*) yang dinilai oleh 2 orang penilai yang independen dengan skala nilai 0 – 21.

## 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 4.3** Tabel penilaian skor BBB

## 4.4 Cara Kerja dan Alur Penelitian

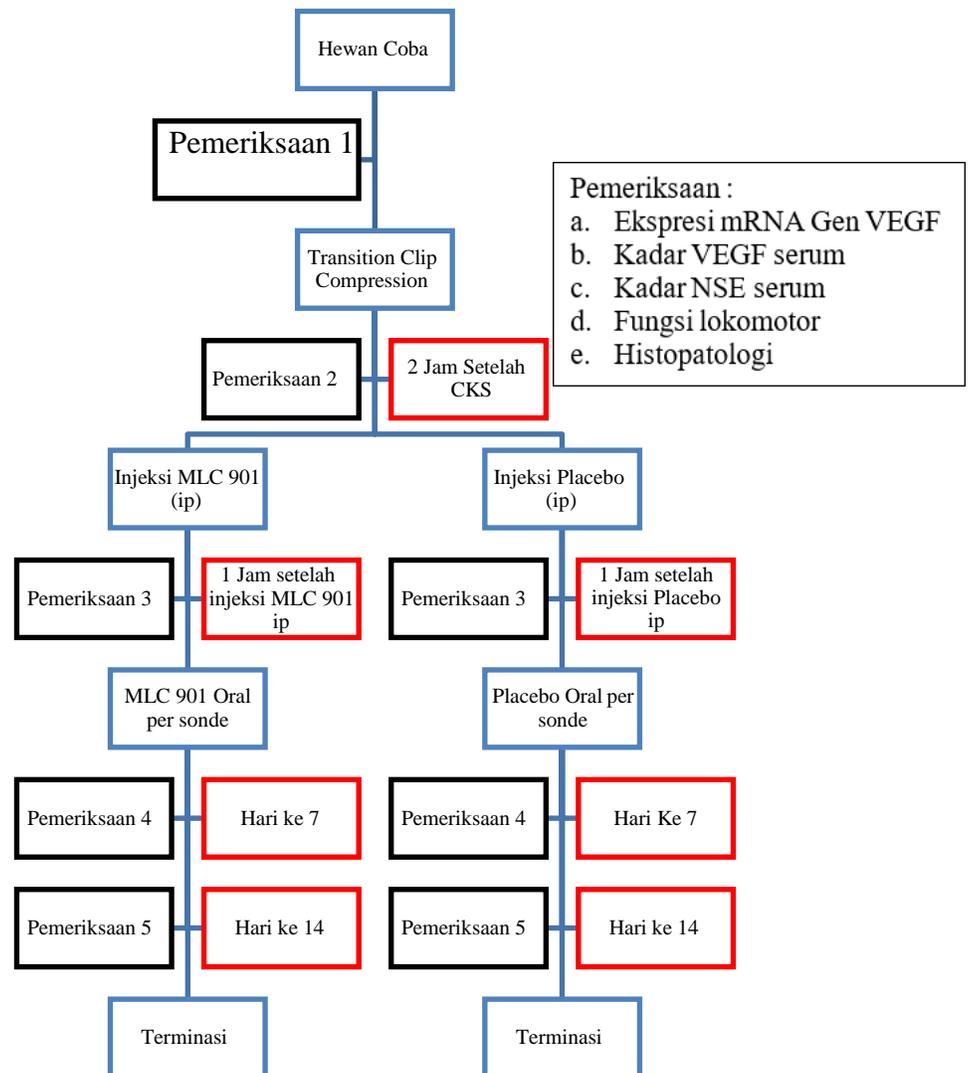
### 4.4.1 Kelompok Penelitian

Tikus *Sprague Dawley* yang memenuhi kriteria penelitian dilakukan randomisasi menjadi 2 kelompok perlakuan, yakni kelompok MLC 901 dan kelompok placebo. Semua tikus diberikan anestesi umum ketamin, trauma yang di berikan pada korda spinalis pada level T2 dengan cara penjepitan dengan menggunakan *Aneurysma clip* yang sudah dimodifikasi kekuatan jepitnya. Cedera korda spinalis

derajat berat akan terjadi setelah penjepitan dengan kekuatan 35 g selama satu menit. Kelompok MLC901 disuntikkan secara intraperitoneal dosis tunggal MLC901 pada konsentrasi 0,075 mg/ml (dalam bolus 500  $\mu$ L) 2 jam setelah CKS diikuti dengan pemberian oral peronde dengan dosis 68,4 mg/hari sampai hewan diterminasi (Quintard et al., 2011, 2014; Rosyidi et al., 2020).

#### 4.4.2 Alur Penelitian

Subyek penelitian dibagi dalam 2 kelompok, secara skematis rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut :



**Gambar 4.4** Alur penelitian

Keterangan gambar :

Pemeriksaan 1 = Sebelum CKS (Pemeriksaan a, b dan c)

Pemeriksaan 2 = 2 jam pasca CKS, sebelum injeksi MLC901 (Pemeriksaan a, b, c dan d)

Pemeriksaan 3 = 1 jam pasca injeksi MLC901 (Pemeriksaan a, b, c dan d)

Pemeriksaan 4 = hari ke 7 pasca CKS (Pemeriksaan a, b, c dan d)

Pemeriksaan 5 = hari ke 14, sebelum terminasi hewan coba (Pemeriksaan a, b, c, d dan e).

#### 4.4.3 Keterangan Alur Penelitian

##### Aklimatisasi.

Tikus *Sprague Dawley*, umur 3-4 bulan, berat 300 gram ditempatkan secara berkelompok (6 ekor tiap kelompok) dalam kandang dengan temperatur ruangan  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap (siklus terang dimulai 6:00 am sampai 18:00 pm). Selama penelitian kebutuhan makanan dan minuman dijaga dalam jumlah yang cukup, diaklimatisasi selama 7 hari, makan dan minum *ad libitum*. Hewan coba yang sakit atau mati dikeluarkan dari penelitian. Ditimbang berat badannya, dan tikus dimasukkan dalam kelompok perlakuan secara acak lengkap.

##### Prosedur pelaksanaan.

###### A. Alat dan bahan

1. Penelitian dilakukan pada hewan coba tikus *Sprague Dawley* jantan, warna putih, berat badan 250 - 300 g, usia 3 bulan ditempatkan di kandang dengan suhu dan kelembaban yang terkontrol ( $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) dengan siklus terang dan gelap tiap 12 jam di unit hewan coba laboratorium Mikrobiologi dan Biologi Molekular dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanudin.
2. Obat anestesi : Ketamin injeksi dan *xylazine*
3. Bahan desinfektan : batadine dan alkohol 70%
4. MLC901 injeksi dan kapsul
5. Alat bedah mikro untuk *laminectomy*
6. *Clip aneurysma* yang telah dimodifikasi sehingga berkekuatan 35 gr untuk cedera berat. Dengan menggunakan *Yasargil Clip* yang sudah dimodifikasi di Bagian Teknik Mesin, Fakultas Teknologi Industri, Institut

Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya hingga mempunyai kekuatan jepitan seberat 35 g.



**Gambar 4.5** *Yasargil Clip* yang sudah dimodifikasi

**B. Metode pemberian obat**

Injeksi dan per oral.

**C. Cara penelitian**

1. Sebelum perlakuan CKS, tikus diambil darahnya untuk mengukur ekspresi mRNA gen VEGF, kadar VEGF serum, kadar NSE serum dan fungsi lokomotor hewan coba untuk semua kelompok.
2. Tikus dioperasi dengan pembiusan umum (ketamin HCl 60mg/kgBB) intraperitoneal (IP).
3. Dilakukan pencukuran rambut dan tindakan aseptik dengan betadine di daerah punggung tikus.
4. Dilakukan laminektomi di vertebra T2 dan duramater dibersihkan dari jaringan sekitar dengan menggunakan disektor.
5. Kompresi dilakukan selama 1 menit dengan menggunakan *Aneurysma Clip* yang telah dimodifikasi sehingga memiliki kekuatan 35 g untuk menghasilkan cedera korda spinalis berat.
6. *Aneurysma Clip* kemudian dilepaskan dan luka ditutup kembali dengan cara dijahit.
7. 2 jam setelah perlakuan CKS (sesaat sebelum diberikan injeksi MLC901 ip), tikus diambil darahnya untuk ekspresi mRNA gen VEGF, kadar VEGF serum, kadar NSE serum dan fungsi lokomotor.

8. 1 jam setelah injeksi MLC901 ip, tikus diambil kembali darahnya untuk mengukur ekspresi mRNA gen VEGF, kadar VEGF serum, kadar NSE serum dan fungsi lokomotor.
9. Selanjutnya MLC901 diberikan peronde dengan dosis konversi 68,4 mg/hari sampai terminasi hewan coba pada hari ke 14.
10. Hari ke 7 pasca perlakuan CKS, tikus diambil kembali darahnya untuk mengukur ekspresi mRNA gen VEGF, kadar VEGF serum, kadar NSE serum dan fungsi lokomotor.
11. Hari ke 14 pasca perlakuan CKS (sebelum terminasi), tikus diambil kembali darahnya untuk mengukur ekspresi mRNA gen VEGF, kadar VEGF serum, kadar NSE serum dan fungsi lokomotor.
12. Setelah terminasi, jaringan korda spinalis dipotong dan diperiksa secara histopatologis.

#### **4.5 Metode Pemeriksaan dan Pewarnaan**

##### **4.5.1 Teknik Pemrosesan Jaringan Dengan Metode Paraffin**

Bahan yang telah diisolasi dari hewan coba segera difiksasi dengan formalin buffer 10% (pH : 7,4), selama 15 - 24 jam (ketebalan jaringan sekitar 0,5 cm). Adapun tujuan fiksasi adalah untuk mempertahankan morfologi sel seperti semula, mencegah otolisis dan mencegah pertumbuhan bakteri atau jamur. Setelah dilakukan fiksasi, jaringan tersebut dicuci dengan air mengalir sekitar 20 menit, kemudian dilakukan dehidrasi dengan menggunakan etanol persentase yang meningkat yaitu dari 70%, 80%, (a'1 jam), kemudian etanol 95% dua kali, yaitu etanol 95% pertama selama 2 jam dan etanol 95% berikutnya selama 1 jam. Setelah itu dimasukkan lagi ke dalam etanol absolut (100%) masing-masing 1 jam. Setelah dilakukan dehidrasi, kemudian dilakukan penjernihan (*clearing*) dengan menggunakan xylol. Tujuan dari penjernihan ini adalah medium mediator yang menghilangkan larutan dehidran dari jaringan dan juga dapat saling larut dengan bahan *embedding* (paraffin), sehingga paraffin dapat melakukan infiltrasi ke dalam jaringan yang diproses. Adapun tahapannya adalah dengan memasukkan jaringan ke dalam xylol tiga kali, di mana

pada xylol pertama dan kedua masing-masing satu jam, dan pada xylol ke tiga dua jam. Setelah dilakukan penjernihan, maka jaringan tersebut dimasukkan ke dalam paraffin cair (56-58°C) sebanyak tiga kali masing-masing dua jam. Adapun tujuannya adalah agar bahan *embedding* ini selain melarutkan bahan xylol, di dalam jaringan paraffin juga melakukan infiltrasi ke dalam jaringan. Sehingga pada saat *embedding* jaringan tersebut benar-benar menyatu dan memiliki konsistensi yang hampir sama, sehingga mudah dilakukan penyayatan dengan *microtome*. Adapun ketebalan sayatan jaringan dengan menggunakan *microtome* ini adalah sekitar 4-6 $\mu$ . Jaringan yang telah disayat kemudian diambil dengan kuas kemudian diletakkan di permukaan air pada *waterbath* dengan temperatur sekitar (45-55°C). Setelah itu diambil dengan menggunakan *object glass* yang telah dilapisi dengan poly L lisin. Selanjutnya dikeringkan pada *plate* panas (sekitar 58-60°C) selama satu jam, kemudian didinginkan pada suhu kamar dan siap diwarnai.

#### 4.5.1 Prosedur Pewarnaan

Jaringan yang telah disayat dengan *microtome* diletakkan pada *object glass* kemudian dilakukan *deparaffinisasi*, yaitu menarik atau menghilangkan paraffin yang ada di dalam jaringan. Adapun caranya dengan memasukkan sayatan jaringan tersebut secara berturut-turut ke dalam xylol sebanyak tiga kali (@dua menit), kemudian secara berturut-turut dimasukkan ke dalam etanol dengan konsentrasi menurun bertahap, yaitu mulai dari etanol 100% (tiga kali) @satu menit, kemudian 95% (dua kali) @satu menit, selanjutnya 90%, 80%, dan 70% masing-masing satu menit. Setelah itu dilakukan pencucian dengan air kran sekitar lima menit, kemudian dimasukkan kedalam Harris *Haematoxylin* (enam menit), kemudian dibilas dengan air dan dimasukkan ke dalam alkohol asam 1% (3-5 celup) dibilas lagi dengan air. Kemudian dicelupkan pada air amoniak (sampai berwarna biru), selanjutnya dimasukkan ke dalam larutan eosin, dan berturut-turut dimasukkan ke dalam etanol 95% (dua kali) (@satu menit), xylol (tiga kali) (@dua menit). Selanjutnya dilakukan *mounting* dengan entelan dan diamati pada mikroskop. Prosentasi kerusakan jaringan dan kavitas dihitung dengan menggunakan komputer dengan aplikasi Digmizer image analysis versi 5.7.2.

#### 4.6 Pemeriksaan Kadar NSE Serum Menggunakan ELISA

Cara kerja *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untuk menentukan kadar protein gen target pada serum/plasma. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) adalah salah satu teknik biokimia yang terutama digunakan dalam bidang imunologi untuk mendeteksi kehadiran antibodi atau antigen dalam suatu sampel. ELISA telah digunakan sebagai alat diagnostik dalam bidang medis, patologi tumbuhan, dan juga berbagai bidang industri.

Penggunaan ELISA melibatkan setidaknya satu antibodi dengan spesifitas untuk antigen tertentu sampel dengan jumlah antigen yang tidak diketahui dimobilisasi pada suatu permukaan solid (biasanya berupa lempeng microtiter polistirene), baik yang non-spesifikasi (melalui penyerapan pada permukaan) atau spesifik (melalui penangkapan oleh antibodi lain yang spesifik untuk antigen yang sama, disebut „*sandwich* ELISA).

Setelah antigen dimobilisasi, antibodi pendeteksi ditambahkan, membentuk kompleks dengan antigen. Antibodi pendeteksi dapat berikatan juga dengan enzim, atau dapat dideteksi secara langsung oleh antibodi sekunder yang berikatan dengan enzim melalui biokonjugasi. Di antara tiap tahap, plate harus dicuci dengan larutan deterjen lembut untuk membuang kelebihan protein atau antibodi yang tidak terikat. Setelah tahap pencucian terakhir, dalam plate ditambahkan substrat enzimatik untuk memproduksi sinyal yang visibel, yang menunjukkan kuantitas antigen dalam sampel. Teknik ELISA yang lama menggunakan substrat kromogenik, meskipun metode-metode terbaru mengembangkan substrat fluorogenik yang jauh lebih sensitif.

ELISA dapat mengevaluasi kehadiran antigen dan antibodi dalam suatu sampel, karenanya merupakan metode yang sangat berguna untuk menentukan konsentrasi antibodi dalam serum (seperti dalam tes HIV), dan juga untuk mendeteksi adanya antigen. Metode tersebut juga bisa diaplikasikan dalam industri makanan untuk mendeteksi allergen potensial dalam makanan seperti susu, kacang, walnut,

almond, dan telur. ELISA juga dapat digunakan dalam bidang toksikologi untuk uji pendugaan cepat pada berbagai kelas obat. (Hatta, 2015).

## **4.7 Prosedur Pemeriksaan Ekspresi Gen Reseptor VEGF**

### **4.7.1 Ekstraksi *Nucleic Acid***

Volume sampel sekitar 100 µg/ul jaringan/darah dimasukkan kedalam 900 µl larutan "L6" yang terdiri dari 120g *Guanidium thyocianate* (GuSCN) (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland, cat no.50990) dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4, 22 ml 0.2 M *Ethylen Diamine Tetra Acetat* (EDTA) pH 8.0 dan 2.6g Triton X-100 (Packard, Instruments) dengan konsentrasi akhir 50 mM Tris HCl, 5 M GuSCN, 20 mM EDTA, 0.1% Triton X-100. Selanjutnya ditambahkan suspensi diatom 20 µl yang terdiri dari 50ml H<sub>2</sub>O dan 500 µl dari 32% (w/v) "Celite" ("diatom") (Jansen Chimica, Beerse, Belgium, 10.846.79). Dimana 20 µl suspensi diatom tersebut dapat mengikat 10 µg RNA/DNA jaringan/darah, kemudian dilakukan "vortex" dan disentrifuse di dalam tabung Eppendorf 1.5 ml dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 detik.

Supernatan dibuang dan sedimen dicuci dengan larutan "L2" yang terdiri dari 120g GuSCN dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4 yaitu dengan menambahkan 1 ml larutan "L2". Selanjutnya di vortex dan di sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 detik, kemudian pencucian diulangi sebanyak 2 kali dengan menggunakan larutan "L2", dilanjutkan dengan pencucian dengan 1 ml etanol 70% sebanyak 2 kali dan 1 ml aseton. Hasilnya kemudian dipanaskan dalam waterbath pada suhu 56°C selama 10 menit dan ditamahkan 60 µl larutan "TE" yang terdiri dari 1 mM Tris HCl pH 8.0, kemudian dilakukan vortex dan dilanjutkan sentrifuse dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit, kemudian di inkubasi dalam oven selama 10 menit pada suhu 56°C. kemudian dilakukan vortex dan sentrifuse ulang selama 30 detik. Pada kecepatan 13.000 rpm dan diambil supernatannya. Supernatant dari proses tersebut akan diperoleh hasil ekstraksi nukleotida dan disimpan pada suhu -80°C sebelum dilakukan analisis PCR (Hatta, 2015).

#### 4.7.2 Cara Kerja Realtime PCR Untuk Menentukan Profil Ekspresi mRNA Gen Target

Mendeteksi gen mRNA VEGF menggunakan primer spesifik *forward* dan *reverse*. Protokol PCR: dilakukan penggandaan DNA dengan siklus 94°C selama 3 menit, siklus diulang 38 kali dengan 54°C (30 detik). QRT-PCR menggunakan green QRT-PCR master mix kit, ssatu tahap. Protokol tersebut dioptimalkan untuk instrumen Mx4000. Protocol disesuaikan menggunakan instrument dengan mengubah pengenceran pewarna berdasarkan petunjuk manual dan mengikuti instrument pabrik yang direkomendasikan untuk program siklus RT-PCR. Refrensi pewarna pasif dimasukan dalam reaksi, diencerkan 1:500. Larutan yan mengandung pewrna dijauhkan dari cahaya.

Mengencerkan 2 x SYBR green QRT-PCR master mix dan disimpan di atas es. mengikuti pencairan awal master mix, bagian yang tak digunakan disimpan pada 4°C dengan catatan, menghindari siklus beku-cair yang berulang. Reaksi percobaan disiapkan dengan menambahkan komponen-komponen berikut. Menyiapkan campuran reagen untuk reaksi menggunakan beberapa komponen seperti di bawah tersebut. Campuran reagen dengan mengamb volume akhir 25 µl (termasuk RNA percobaan) 12,5 µl dari 2 x SYBR green QRT-PCR master mix ditambah x µl dari primer awal (konsentrrasi dioptimalkan) di tambah lagi *nuclease* – bebas PCR – tingkat H2 x µl primer akhir (konsentrrasi dioptimalkan) dan juga 0,375 µl larutan perwarna referens dari tahap 1 (opsional) sert 1,0 µl dari RT/Rnase campuran enzim blok dengan 50 µl total volume reaksi juga dapat digunakan.

Reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk gelembung (tidak dirotasi), Kemudian distribusikan campuran ke tabung reaksi percobaan dengan menambahkan x µl RNA percobaan pda setiap tabung reaksi. Reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk gelembung (tidak dirotasi). Reaksi disentrifuse dengan singkat dan reaksi ditempatkan dalam instrumen dalm program PCR siap dijalankan dengan menggunakan mesin *Real time* PCR (CFX Connect system, biorad laboratories, *Real time* PCR 96 well 0.1 ml, USA).

#### 4.8 Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Animal bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar. Pemeriksaan biomolekuler dilakukan di laboratorium Biomolekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar. Pemeriksaan histopatologis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RS UNHAS Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

#### 4.9 Etika Penelitian

Penelitian ini sudah mendapatkan izin dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dengan Nomor : 599/UN4.6.4.5.31/PP36/2020.

#### 4.10 Jenis dan Cara Pengumpulan Data

Data hasil penelitian dikumpulkan dalam bentuk data primer. Untuk menjamin reliabilitas dan validitas dilakukan hal-hal sebagai berikut:

**Tabel 4.1** Jenis dan cara pengumpulan data

Jenis Data	Cara Pengumpulan	Pemeriksaan
Ekspresi mRNA VEGF	Darah	PCR
Kadar VEGF serum	Darah	ELISA
Kadar NSE serum	Darah	ELISA
Neurogenesis (Neuron)	Jaringan korda spinalis	HE
Fungsi Lokomotor	Kekuatan motorik	Tes BBB

#### 4.11 Rancangan Kegiatan

Berikut rancangan kegiatan penelitian yang akan dilakukan:

**Tabel 4.2** Rancangan kegiatan

No	Kegiatan	Bulan											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Persiapan hewan coba	x	x										
2	Perlakuan hewan coba			x									
3	pemeriksaan /evaluasi hasil jaringan di Laboratorium				x	x	x						
4	Analisis data							x	x				
5	Pembahasan Hasil									x	x	x	
6	Penyusunan Laporan										x	x	

#### 4.12 Analisis Data

Data diolah dan dianalisis dengan bantuan komputer menggunakan program Excel 2013 dan SPSS versi 22. Efek pemberian MLC 901, yaitu ekspresi mRNA VEGF, kadar VEGF dan kadar NSE serum akan ditampilkan dalam bentuk *mean* (standar deviasi) dengan *confidence interval* (95% CI). Untuk melihat perbedaan rerata ekspresi mRNA VEGF, kadar VEGF dan kadar NSE serum pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol berdasarkan waktu pengamatan yang berbeda dilakukan uji ANOVA *Repeated Measurement*. Untuk melihat perbedaan rerata antar kelompok yang bermakna dari uji ANOVA *Repeated Measurement* maka dilakukan uji post hoc *Least Significantly Difference* (LSD).

## **BAB 5**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Cedera korda spinalis menyebabkan disfungsi neurologis, memiliki mortalitas dan morbiditas yang tinggi di seluruh dunia, dan saat ini tidak ada intervensi terapeutik yang efektif menyebabkan disfungsi neurologis permanen dan juga beban ekonomi bagi jutaan individu dan keluarga di seluruh dunia. Cedera korda spinalis terbagi menjadi dua fase, fase primer yang melibatkan cedera mekanis awal seperti fraktur atau dislokasi vertebra sehingga memberikan kerusakan pada korda spinalis dan fase sekunder yang mengacu pada kerusakan progresif yang tertunda dan berlanjut setelah cedera primer dan dapat berlangsung selama berminggu-minggu atau bahkan bertahun-tahun. Fase sekunder melibatkan disfungsi vaskular, edema, iskemia, eksitotoksisitas, pergeseran elektrolit, produksi radikal bebas, inflamasi dan kematian sel. VEGF merupakan protein angiogenesis yang memiliki berbagai peran angiogenesis dan neuroprotektif, selain itu VEGF juga memiliki peran negatif seperti edema. Pada kerusakan neuronal serta gangguan membran sel, sawar darah otak terganggu sehingga NSE berdifusi kedalam ekstraselular dan cairan serebrospinal. *Neuron-specific enolase* (NSE) adalah protease asam yang unik untuk neuron dan sel neuroendokrin. Ini adalah indikator sensitif untuk menilai tingkat keparahan kerusakan sel saraf dan prognosis. Pada kerusakan neuronal serta gangguan membran sel, sawar darah otak terganggu sehingga NSE berdifusi kedalam ekstraselular dan cairan serebrospinal. Penelitian ini akan mengkaji penggunaan MLC 901 terhadap ekspresi mRNA gen VEGF, kadar VEG, Kadar NSE, Gambaran histopatologis korda spinalis dan fungsi lokomotor pada model cedera korda spinalis pada hewan coba tikus (*Sprague Dawley*).

Dari percobaan yang telah dilakukan, dilakukan analisis statistik untuk mendapatkan interpretasi hasil, dalam kaitannya dengan kerangka konsep dan hipotesis penelitian.

## 5.1 Hasil Penelitian

### 5.1.1 Karakteristik Subyek Penelitian

Karakteristik hewan model yang digunakan, seperti berat badan, tertera dalam tabel berikut.

**Tabel 5.1** Data berat badan tikus *Sprague Dawley*

	Perlakuan	Berat badan tikus (gram)	p-value
Rerata	Kontrol	264,40 +/- 8,35	0,48
	MLC901	261,20 +/- 4,76	

Keterangan : Uji Homogenitas berat badan tikus *Sprague Dawley* sebagai model cedera kepala

Hewan coba pada penelitian ini adalah *Rattus norvegicus* strain *Sprague Dawley*, dengan rata-rata berat badan pada kelompok kontrol 264.8 (  $\pm$  8,35) gram dan pada kelompok MLC 901 261,2 (  $\pm$  4,76) dengan menggunakan uji homogenitas *lavene test*, tampak bahwa nilai  $p \geq 0.05$  , sehingga bisa dinyatakan berat badan tikus tidak berbeda secara signifikan yang berarti perbedaan ekspresi berbagai variable pemeriksaan diharapkan merupakan pengaruh dari induksi cedera korda spinalis maupun paparan MLC 901. Konsep cedera korda spinalis merupakan jejas atau perlukaan jaringan korda spinalis bukan karena proses degeneratif atau bawaan lahir, melainkan akibat dorongan dari luar yang dapat mengakibatkan kerusakan pada jaringan korda spinalis sehingga terjadi disfungsi neurologis.

Penelitian ini menggunakan model cedera korda spinalis dengan menggunakan *Aneurysma clip* yang telah dimodifikasi kekuatan jepitannya (Poon et al., 2007). Untuk membuktikan apakah trauma yang dilakukan telah dapat menimbulkan cedera korda spinalis dilakukan pemeriksaan secara histopatologis pada jaringan korda spinalis.

### 5.1.2 Efek pemberian MLC 901 terhadap ekspresi mRNA VEGF pada hewan coba tikus dengan cedera korda spinalis

Dilakukan pengamatan ekspresi mRNA gen VEGF, kadar VEGF, Kadar NSE, gambaran histopatologis, dan fungsi lokomotor. Pemberian MLC 901 dilakukan terhadap kelompok hewan model secara intraperitoneal dengan dosis tunggal MLC 901 pada konsentrasi 0,075 mg/ml dan diikuti dengan pemberian oral peronde dengan dosis konversi 68,4 mg/hari sampai hewan diterminasi.

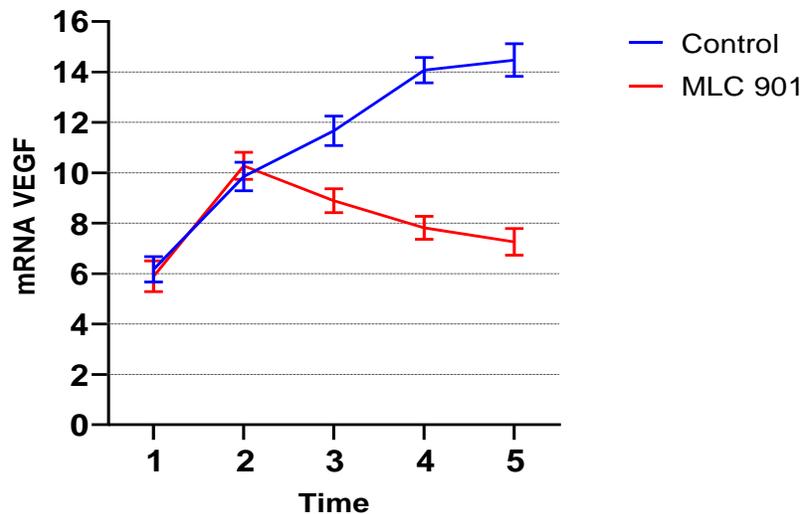
**Tabel 5.2** Efek MLC 901 terhadap ekspresi mRNA gen VEGF pada hewan coba tikus dengan cedera korda spinalis

Waktu	Pemberian MLC901	mRNA gen VEGF		Perbedaan Rerata	P
		Mean	Std. Deviation		
Sebelum Perlakuan	(+)	5,89	0,62	-0,28	0,45
	(-)	6,17	0,50		
2 jam setelah perlakuan	(+)	10,28	0,54	0,42	0,26
	(-)	9,86	0,56		
3 jam setelah perlakuan (1 jam setelah pemberian MLC 901)	(+)	8,89	0,47	-2,78	0,00
	(-)	11,67	0,58		
7 hari setelah perlakuan	(+)	7,81	0,45	-6,26	0,00
	(-)	14,07	0,50		
14 hari setelah perlakuan	(+)	7,26	0,53	-7,21	0,00
	(-)	14,47	0,65		

Uji statistik dengan T-independent test, dengan kemakanaan  $p < 0,05$

Pada penelitian ini, 3 jam setelah cedera korda spinalis (1 jam setelah pemberian MLC 901) rerata ekspresi mRNA VEGF pada kelompok yang diberi MLC 901 (8,89) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol (11,67) dan bermakna secara statistik ( $p \leq 0.05$ ), hal ini sejalan pada hari ke 7 setelah cedera korda spinalis, didapatkan hasil rerata ekspresi mRNA VEGF pada kelompok yang

diberi MLC 901 (7,81) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol (14,07) dan bermakna secara statistik ( $p \leq 0,05$ ). Rerata mRNA VEGF pada kelompok MLC 901 tetap lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol hingga hari ke 14, dimana pada kelompok MLC 901 (7,26) dibandingkan kelompok kontrol (14,47) dan bermakna secara statistik ( $p \leq 0,05$ ).



**Gambar 5.1** Ekspresi mRNA VEGF pada hewan coba tikus dengan dan tanpa pemberian MLC 901 berdasarkan waktu perlakuan

Gambaran rerata ekspresi mRNA VEGF pada hewan coba tikus dengan dan tanpa pemberian MLC 901, terlihat adanya peningkatan garis grafik dimulai sejak 2 jam setelah perlakuan pada kedua kelompok. Namun pada 3 jam setelah perlakuan (1 jam setelah pemberian MLC 901), tampak terjadi perbedaan garis grafik dari kedua kelompok. Terlihat, pada kelompok dengan MLC 901 mengalami penurunan garis grafik hingga 14 hari setelah perlakuan sedangkan kelompok plasebo tetap mengalami kenaikan garis grafik hingga 14 hari setelah perlakuan.

### 5.1.3 Efek pemberian MLC 901 terhadap kadar VEGF pada hewan coba tikus dengan cedera korda spinalis

Selain pemeriksaan mRNA VEGF yang dinilai dengan analisis PCR *real time* kuantitatif, juga diamati kadar VEGF pada model hewan yang dinilai dengan metode ELISA. Terjadi penurunan kadar VEGF pada kelompok MLC 901 dibandingkan pada

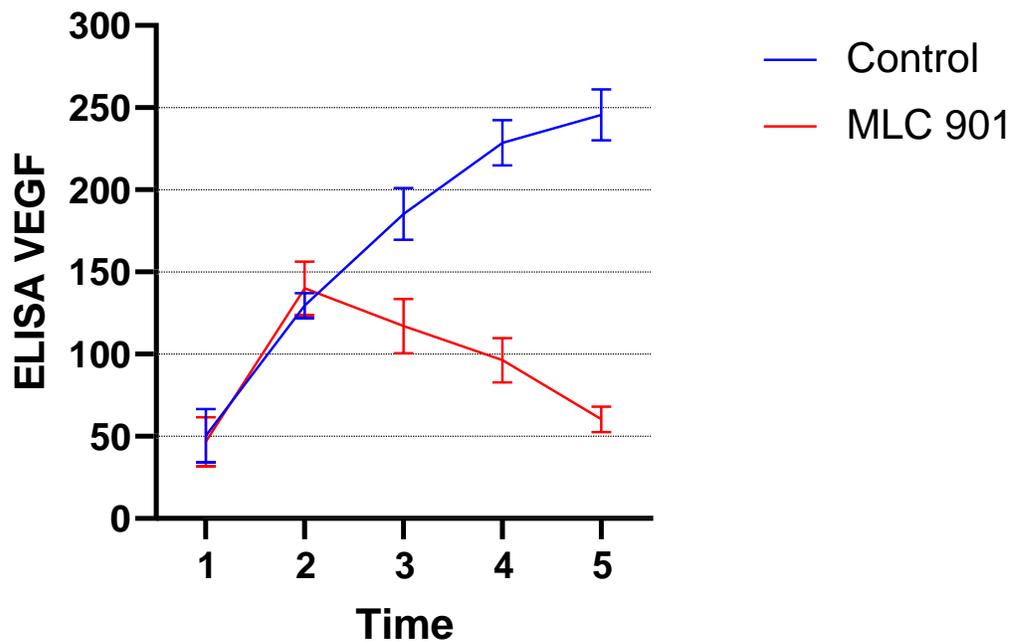
kelompok kontrol sejak 3 jam setelah cedera korda spinalis (1 jam setelah pemberian MLC 901) hingga 14 hari setelah cedera korda spinalis.

**Tabel 5.3** Efek MLC 901 terhadap kadar VEGF pada hewan coba tikus dengan cedera korda spinalis

Waktu	Pemberian MLC901	VEGF ELISA		Perbedaan Rerata	P
		Mean	Std. Deviation		
Sebelum Perlakuan	(+)	46,97	14,91	-3,65	0,74
	(-)	50,34	16,24		
2 jam setelah perlakuan	(+)	140,12	16,32	10,53	0,23
	(-)	129,59	7,46		
3 jam setelah perlakuan (1 jam setelah pemberian MLC 901)	(+)	117,04	16,53	-68,41	0,00
	(-)	185,45	15,70		
7 hari setelah perlakuan	(+)	98,21	11,38	-130,5	0,00
	(-)	228,71	13,94		
14 hari setelah perlakuan	(+)	60,40	7,87	-91,56	0,00
	(-)	245,52	15,64		

Uji statistik dengan T-independent test, dengan kemaknaan  $p < 0,05$

Pada 3 jam setelah cedera korda spinalis didapatkan hasil rerata kelompok MLC 901 (117,04) yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol (185,45) dan bermakna secara statistik ( $p \leq 0,05$ ). Selanjutnya, pada hari ke 7 setelah cedera korda spinalis kelompok MLC 901 juga memiliki rerata kadar VEGF yang lebih rendah (98,21) dibandingkan rerata kadar VEGF pada kelompok kontrol (228,71) dengan hasil statistik yang bermakna ( $p \leq 0,05$ ). Pola yang sama juga didapatkan pada pemeriksaan kadar VEGF hari ke 14, kelompok dengan pemberian MLC 901 tetap menunjukkan rerata kadar VEGF yang lebih rendah (60,40) dibandingkan kelompok kontrol (245,52) dan bermakna secara statistik ( $p \leq 0,05$ ).



**Gambar 5.2** kadar VEGF pada hewan coba tikus dengan dan tanpa pemberian MLC 901 berdasarkan waktu perlakuan

Gambar 5.2 menunjukkan rerata kadar VEGF pada hewan coba tikus dengan dan tanpa pemberian MLC 901 yang menunjukkan adanya peningkatan garis grafik dimulai sejak 2 jam setelah perlakuan pada kedua kelompok. Terdapat perbedaan garis grafik yang dimulai 3 jam setelah perlakuan (1 jam setelah pemberian MLC 901), tampak terjadi perbedaan garis grafik dari kedua kelompok. Terlihat, pada kelompok dengan MLC 901 mengalami penurunan garis grafik hingga 14 hari setelah perlakuan sedangkan kelompok plasebo tetap mengalami kenaikan garis grafik hingga 14 hari setelah perlakuan.

#### 5.1.4 Efek pemberian MLC 901 terhadap kadar NSE pada hewan coba tikus dengan cedera korda spinalis

*Neuron-specific enolase* (NSE) adalah penanda biokimia yang paling banyak diteliti pada kerusakan di jaringan saraf, karena NSE hanya ada dalam konsentrasi

rendah di luar sistem saraf dan ditemukan sebagai biomarker yang relevan dan andal dalam menilai kerusakan pada cedera otak (Loy et al., 2005; Shaik et al., 2019). Kerusakan saraf setelah cedera korda spinalis dikaitkan dengan peningkatan *neuron spesifik enolase* (NSE), yang juga diketahui berperan dalam patogenesis cedera otak hipoksik-iskemik. Dengan demikian, NSE sekarang dianggap sebagai biomarker pada kerusakan otak iskemik, dan baru-baru ini telah disarankan untuk menjadi biomarker pada cedera otak traumatis, stroke dan ensefalopati anoksik setelah serangan jantung dan juga cedera korda spinalis akut (Haque et al., 2016). Selain itu, dengan menggunakan *immunostaining* NSE, dimungkinkan untuk mendeteksi akson yang cedera sedini 1,5 jam setelah cedera pada tikus; dengan demikian, NSE dapat diandalkan untuk menjadi biomarker yang andal untuk cedera aksonal difus (Yokobori et al., 2015).

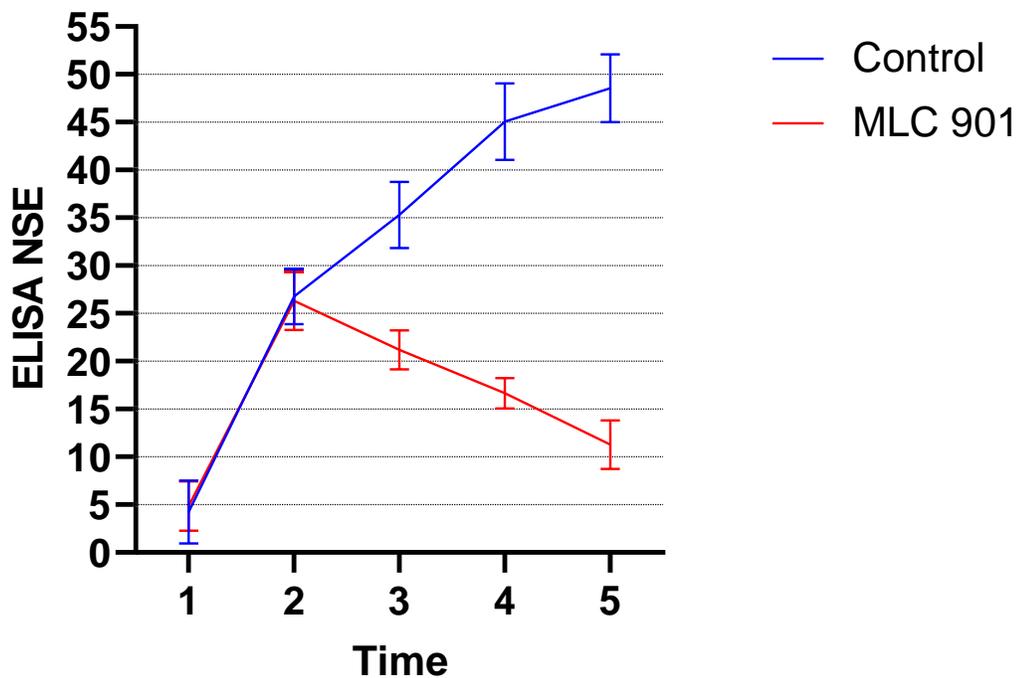
**Tabel 5.4** Efek MLC 901 terhadap kadar NSE pada hewan coba tikus dengan cedera korda spinalis

Waktu	Pemberian MLC901	NSE ELISA		Perbedaan Rerata	P
		Mean	Std. Deviation		
Sebelum Perlakuan	(+)	4,87	2,62	0,66	0,74
	(-)	4,21	3,30		
2 jam setelah perlakuan	(+)	26,33	3,04	-0,45	0,81
	(-)	26,78	2,87		
3 jam setelah perlakuan (1 jam setelah pemberian MLC 901)	(+)	21,20	2,06	-14,11	0,00
	(-)	35,31	3,45		
7 hari setelah perlakuan	(+)	16,63	1,58	-28,43	0,00
	(-)	45,06	4,02		
14 hari setelah perlakuan	(+)	11,27	2,56	-37,28	0,00
	(-)	48,55	3,57		

Uji statistik dengan T-independent test, dengan kemaknaan  $p < 0,05$

Pada penelitian ini, diamati terjadi peningkatan rerata kadar NSE 2 jam setelah cedera korda spinalis baik pada kelompok MLC 901 (26,33) dan kelompok kontrol (26.78) dan bermakna secara statistik. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Cao et al, yang menjelaskan pada waktu 2 jam setelah cedera korda

spinalis, terjadi peningkatan yang signifikan pada NSE dalam serum dan CSF model tikus dengan cedera korda spinalis dan mencapai tingkat maksimum hingga 6 jam setelah trauma (Cao et al., 2008). Namun terjadi perbedaan rerata kadar NSE 3 jam setelah perlakuan ( 1 jam setelah pemberian MLC 901), rerata kadar NSE pada kelompok dengan MLC 901 (21,20) terlihat lebih rendah dibandingkan pada kelompok kontrol (35,31) dengan hasil statistika yang bermakna ( $p \leq 0.05$ ). Selanjutnya pada 7 hari setelah cedera korda spinalis rerata kadar NSE pada kelompok dengan MLC 901 (16,63) menunjukkan rerata yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol (45,06) dan bermakna secara statistik ( $p \leq 0.05$ ). Hal yang sama juga terjadi, dimana kelompok MLC 901 (11,27) tetap menunjukkan hasil yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol (48,55) dan dengan hasil secara statistika bermakna ( $p \leq 0.05$ ).



**Gambar 5.3** Kadar NSE pada hewan coba tikus dengan dan tanpa pemberian MLC 901 berdasarkan waktu perlakuan

Gambaran rerata Kadar NSE pada hewan coba tikus dengan dan tanpa pemberian MLC 901 menunjukkan perbedaan garis grafik dimulai sejak 3 jam

setelah perlakuan (1 jam setelah pemberian MLC 901) terlihat pada kelompok dengan pemberian MLC 901 mengalami penurunan garis grafik hingga hari ke 14, berbeda pada kelompok plasebo yang mengalami peningkatan garis grafik hingga hari ke 14.

### 5.1.5 Efek pemberian MLC 901 terhadap gambaran histopatologi pada hewan coba tikus dengan cedera korda spinalis

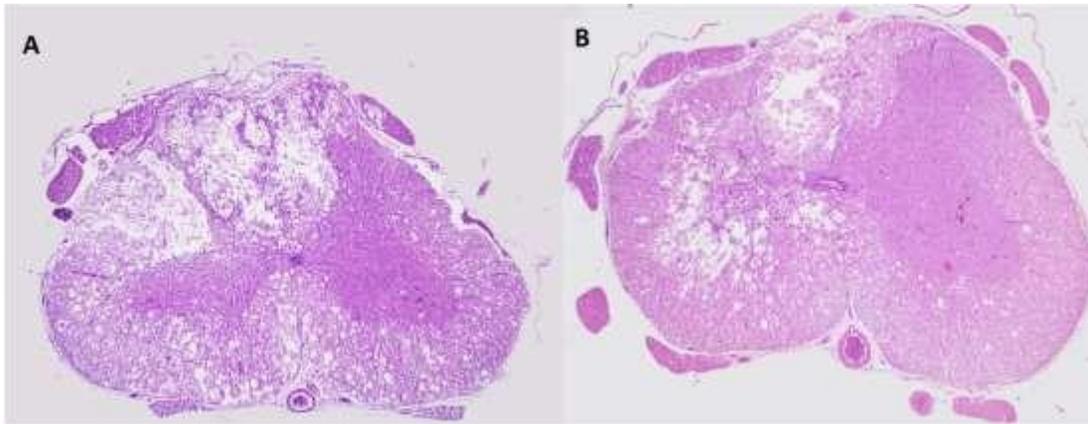
Penelitian ini juga menilai luas kerusakan jaringan dengan melakukan pewarnaan *Haematoxylin Eosin* pada jaringan korda spinalis yang mengalami cedera. Rerata persentase kerusakan jaringan pada hari ke 14 pada kelompok dengan pemberian MLC 901 (27,52) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (71,80) dengan hasil statistika yang bermakna ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabel 5.5** Efek MLC 901 terhadap perubahan gambaran histopatologis pada hewan coba tikus dengan cedera korda spinalis

Waktu	Pemberian MLC901	Persentase kerusakan		Perbedaan Rerata	P
		Mean	Std. Deviation		
14 hari setelah perlakuan	(+)	27,52	8,47	-4,96	0,00
	(-)	71,80	13,43		

Uji statistik dengan T-independent test, dengan kemakanaan  $p < 0,05$

Tabel 5.5 menjelaskan perbedaan persentase kerusakan jaringan korda spinalis pada kedua kelompok yang dinilai menggunakan *software Digmizer Image Analysis*. Terlihat rerata kerusakan pada jaringan korda spinalis kelompok perlakuan yang telah diberikan MLC 901 memiliki rerata yang lebih rendah (27,52%) dibandingkan kelompok yang hanya diberikan plasebo (71,80%) dengan hasil statistika yang bermakna ( $p \leq 0.05$ ).



**Gambar 5.4** Gambaran histopatologis jaringan korda spinalis tikus *Sprague Dawley* model cedera korda spinalis. **A.** Tampak Kerusakan jaringan pada kelompok kontrol 14 hari setelah cedera korda spinalis menggunakan *clip compression* dengan 35 g scale bar. **B.** Terlihat kerusakan jaringan pada kelompok tikus dengan pemberian MLC 901 lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Terlihat pada gambaran histopatologis kelompok kontrol terdapat memiliki volume kavitas yang luas, hal ini seiring dengan penelitian yang dilakukan oleh Poon et al, yang melakukan penjepitan kompresi dengan kekuatan 35 g menggunakan *aneurysma clip* untuk menghasilkan cedera berat pada model tikus (Poon et al., 2007).

Uji korelasi dilakukan pada penelitian ini untuk melihat hubungan antara ekspresi parameter VEGF, kadar ELISA VEGF dan kadar ELISA NSE dengan persentase kerusakan jaringan korda spinalis sebagai gambaran dari besarnya kerusakan korda spinalis pada hewan coba yang diberi MLC 901. Hasil uji korelasi pada hari ke 14 antara mRNA VEGF dan persentase kerusakan menunjukkan hasil terdapatnya korelasi diantara kedua parameter ( $r= 0.909$ ;  $p < 0,05$ ), selanjutnya korelasi antara ELISA VEGF dan persentase kerusakan pada hari ke 14 didapatkan korelasi antara kedua parameter ( $r= 0.924$ ;  $p < 0,05$ ). Penelitian ini menunjukkan adanya hubungan korelasi antara VEGF dengan persentase kerusakan pada hari ke 14 setelah trauma. Hasil uji statistik yang dilakukan pada penelitian ini terdapat hasil korelasi yang positif yang menunjukkan peningkatan VEGF akan selaras dengan peningkatan persentase kerusakan. Berdasarkan hasil dari temuan ini, kami beranggapan bahwa MLC 901 efektif dalam menurunkan persentase kerusakan dengan salah satu mekanismenya yaitu menurunkan level VEGF setelah cedera korda spinalis.

Penelitian ini juga menguji korelasi antara ELISA NSE dan persentase kerusakan pada hari ke 14 terdapat korelasi pada kedua parameter ( $r= 0,935$  ;  $p < 0,05$ ), hasil uji statistika yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan korelasi positif, yang menunjukkan peningkatan ELISA NSE akan meningkatkan persentase kerusakan pada jaringan setelah trauma. Hasil ini, mengindikasikan bahwa MLC 901 juga efektif menurunkan persentase kerusakan dengan salah satu cara yang diberikan melalui kadar NSE pada serum setelah cedera korda spinalis.

### 5.1.6 Efek pemberian MLC 901 terhadap fungsi lokomotor pada hewan coba tikus dengan cedera korda spinalis

Fungsi lokomotor pada hewan coba dinilai dengan menggunakan *Basso, Beattie, Bresnahan* (BBB) *locomotor rating score*. Penilaian ini secara efektif meningkatkan transparansi penelitian cedera korda spinalis, sehingga memungkinkan satu peneliti dengan mudah memahami sistem penilaian yang lain (Fouad et al., 2020).

**Tabel 5.6** Efek MLC 901 terhadap fungsi lokomotor pada hewan coba tikus dengan cedera korda spinalis

Waktu	Intervensi	BBB Score		Perbedaan rerata	P
		Mean	SD		
Hari ke-1	Sebelum intervensi	0.6	0,41	0,40	0,36
	Setelah perlakuan kontrol	1	0,701		
Hari ke-1	Sebelum intervensi	0.7	0,44	0,90	0.08
	Seteleah perlakuan MLC901	1,6	0,54		
Hari ke-7	MLC901	16.5	0,84	12,4	0.01
	Kontrol	4,10	2,99		
Hari ke-14	MLC901	19,50	1,58	13	0,01
	Kontrol	6,5	2,24		

Uji statistik dengan T-independent test, dengan kemakanaan  $p < 0,05$

Penelitian ini menunjukkan, skor BBB pada kelompok yang diberikan MLC 901 terlihat lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Perbedaan rerata skor BBB mulai terlihat pada hari ke 7 setelah cedera korda spinalis dengan rerata skor pada kelompok MLC 901 (16,5) dan kelompok kontrol (4,1) dengan hasil yang bermakna secara statistik. Selanjutnya perbedaan signifikan mulai terjadi pada hari ke 14 setelah cedera korda spinalis, penelitian ini menunjukkan rerata skor pada kelompok dengan pemberian MLC 901 memiliki rerata skor (19,5) yang jauh lebih baik dibandingkan rerata skor pada kelompok kontrol (6,5) dan bermakna secara statistik ( $p \leq 0.05$ ).

Uji korelasi dilakukan pada penelitian ini untuk melihat hubungan antara ekspresi parameter VEGF, kadar ELISA VEGF dan kadar ELISA NSE dengan skor BBB yang menggambarkan fungsi lokomotor pada model hewan tikus dengan cedera korda spinalis. Hasil uji korelasi pada hari ke 14 antara mRNA VEGF dan Skor BBB menunjukkan hasil terdapatnya korelasi diantara kedua parameter ( $r = -0.941$ ;  $p < 0,05$ ), selanjutnya korelasi antara ELISA VEGF dan persentase kerusakan pada hari ke 14 didapatkan korelasi antara kedua parameter ( $r = -0.721$ ;  $p < 0,05$ ). Penelitian ini menunjukkan adanya hubungan korelasi antara VEGF dengan skor BBB pada hari ke 14 setelah trauma. Hasil uji statistik yang dilakukan pada penelitian ini terdapat hasil korelasi yang negatif yang menunjukkan peningkatan VEGF akan menghasilkan skor BBB yang rendah. Berdasarkan hasil dari temuan ini, kami beranggapan bahwa MLC 901 efektif dalam meningkatkan fungsi lokomotor dengan salah satu mekanisme menurunkan level VEGF setelah cedera korda spinalis.

Penelitian ini juga menguji korelasi antara ELISA NSE dan skor BBB pada hari ke 14 terdapat korelasi pada kedua parameter ( $r = -0,956$  ;  $p < 0,05$ ), hasil uji statistika yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan korelasi negatif, yang menunjukkan peningkatan ELISA NSE akan menurunkan skor BBB setelah cedera korda spinalis. Hasil ini, mengindikasikan bahwa MLC 901 juga efektif meningkatkan fungsi lokomotor pada cedera korda spinalis melalui perannya dalam menurunkan kadar NSE.

## 5.2 Pembahasan Penelitian

Setelah cedera korda spinalis penelitian yang dilakukan oleh Bartholdi et al dan Herrera et al, menjelaskan bahwa terjadi penurunan kadar VEGF pada episenter cedera dimulai pada hari pertama hingga 1 bulan pasca cedera korda spinalis (Bartholdi et al., 1997; Herrera et al., 2009). Sebaliknya, pada penelitian in vitro yang dilakukan oleh Skold et al menunjukkan bahwa terjadi *upregulasi* VEGF, reseptor dan koreseptornya di astrosit, hal ini mungkin disebabkan karena tidak adanya sel-sel inflamasi. Penelitian lainnya juga melaporkan setelah cedera korda spinalis, reseptor VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (Flk-1) dan *neurophilin-1* telah terbukti mengalami upregulasi pada reaktif astrosit 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 hari ke 14 dan seterusnya (Choi et al., 2007; Sköld et al., 2000) . Hal ini menunjukkan bahwa VEGF dan dua resptor tirosin kinasenya memiliki peran dalam proses inflamasi dan respon astrositik setelah cedera korda spinalis kontusif (Walker & Xu, 2018).

Penelitian ini menunjukkan adanya penurunan rerata ekspresi mRNA VEGF pada kelompok yang diberi MLC 901 dibandingkan kelompok kontrol yang memiliki rerata ekspresi mRNA VEGF yang sangat tinggi, dimulai setelah 1 jam pemberian MLC 901 hingga hari ke 14 setelah cedera korda spinalis. Meskipun VEGF merupakan molekul pensinyalan penting yang terkait angiogenesis hingga neuroproteksi (Walker & Xu, 2018). Di sisi lain, pemberian VEGF dapat meningkatkan peningkatan permeabilitas BSCB pada periode akut dan sub akut bahkan hingga fase kronis (Long et al., 2015). Selain itu pada kondisi iskemia berat di otak level VEGF yang tinggi, dapat memperburuk kerusakan jaringan melalui peningkatan kebocoran BBB sehingga menghasilkan edema pada jaringan otak. Tingginya level VEGF juga dapat meningkatkan ekstravasasi glutamat dan albumin, yang dapat mengaktifkan astrosit dan mengganggu homeostasis K<sup>+</sup> di parenkim jaringan yang mengakibatkan hiper aktivitas neuron dan stress (Lange et al., 2016).

Di sisi lain, penelitian ini juga menunjukkan bahwa kelompok kontrol mRNA VEGF tetap mengalami fluktuasi hingga hari ke 14 setelah cedera korda spinalis dan berbeda dibandingkan kelompok MLC 901 yang mengalami penurunan dimulai dari

3 jam setelah trauma hingga hari ke 14. Peningkatan ekspresi mRNA VEGF pada kelompok kontrol ini sejalan dengan penelitian semi-quantitative RT-PCR yang dilakukan oleh Choi et al, yang menginvestigasi peran VEGF pada korda spinalis yang cedera dan mendapatkan hasil peningkatan dari VEGFR 1 dan VEGFR 2 dimulai dari hari pertama hingga hari ke 14 setelah cedera korda spinalis (Choi et al., 2007). Hal ini menunjukkan efektivitas pemberian MLC 901 dalam mencegah tingginya level VEGF sehingga mencegah perburukan kerusakan jaringan melalui gangguan permeabilitas BSCB.

Menariknya rerata mRNA VEGF pada kelompok MLC 901 dimulai dari 1 jam setelah pemberian MLC 901 hingga 14 hari setelah cedera korda spinalis tetap diatas rerata mRNA VEGF basal, yang memungkinkan tetap terjadinya efek neuroproteksi dari VEGF terhadap korda spinalis. Seperti yang telah diketahui VEGF tidak hanya berperan sebagai molekul pensinyalan yang memiliki kaitan dengan angiogenesis namun juga memiliki peran neuroproteksi, survival dan migrasi sel schwan, dan proliferasi dari astrosit, microglia dan neural stem cells (Walker & Xu, 2018).

Penelitian ini juga menunjukkan terjadi peningkatan kadar VEGF pada kelompok kontrol setelah cedera korda spinalis dan berlangsung hingga hari ke 14 setelah cedera korda spinalis. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Choi et al, yang mendapatkan hasil peningkatan dari VEGFR 1 dan VEGFR 2 dimulai dari hari pertama hingga hari ke 14 setelah cedera korda spinalis (Choi et al., 2007). Sebaliknya, kadar VEGF pada kelompok MLC 901 mengalami peningkatan setelah 2 jam perlakuan dan mengalami penurunan setelah 3 jam perlakuan (1 jam setelah pemberian MLC 901) dan terus menurun hingga hari ke 14 setelah cedera korda spinalis.

Sejalan dengan hasil pada pemeriksaan ekspresi mRNA VEGF pada kelompok MLC 901, penelitian ini juga menunjukkan kadar VEGF pada kelompok tersebut yang meningkat pada 2 jam setelah perlakuan dan terus menurun hingga hari ke 14 namun tidak pernah mencapai kadar basal VEGF pada kelompok tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa MLC 901 mencegah efek dari tingginya level VEGF yang dapat mengakibatkan gangguan permeabilitas pada BSCB sehingga terjadi edema pada jaringan yang akan semakin memperburuk kerusakan jaringan (Long et al., 2015). Pola penurunan VEGF pada kelompok ini yang tidak pernah

mencapai kadar basal hingga hari ke 14 membuktikan bahwa MLC 901 juga tetap mempertahankan efek neuroprotektor yang diberikan VEGF (Walker & Xu, 2018).

Sedangkan pada pemeriksaan kadar NSE, penelitian ini menunjukkan hasil yang berbeda bila dibandingkan penelitian yang dilakukan oleh Cao et al, dimana kelompok kontrol tetap mengalami peningkatan NSE hingga 14 hari setelah perlakuan sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Cao et al menunjukkan peningkatan NSE pada serum dan CSF dimulai dari 2 jam setelah trauma dan mengalami penurunan 6 jam setelah trauma (Cao et al., 2008). Selain itu penelitian ini juga menunjukkan hasil adanya perbedaan rerata kadar VEGF secara signifikan yang tampak setelah pemberian MLC 901 dibandingkan tanpa pemberian MLC 901 dimulai pada 1 jam setelah pemberian MLC 901. Hasil ini menjelaskan bahwa ada kemungkinan peningkatan ekspresi dan aktivitas NSE setelah cedera korda spinalis meningkatkan kejadian inflamasi di korda spinalis dan mengaktifkan jalur degradatif yang mengarah ke aktivasi sitokin/ kemokin inflamasi, yang akan memperburuk kerusakan sekunder cedera korda spinalis. Studi yang dilakukan oleh Haque et al menunjukkan bahwa NSE meningkat secara nyata setelah SCI akut dan bahwa penghambatan NSE oleh *ENOblock* menurunkan kadar NSE dalam serum dan jaringan korda spinalis, sehingga melemahkan sitokin inflamasi dan kemokin dalam serum, dan mengurangi aktivasi glial (Haque et al., 2016, 2017, 2018).

Penelitian ini juga membuktikan pemberian MLC 901 menurunkan kadar NSE dan hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Quintard et al, penelitian tersebut menunjukkan model tikus yang mengalami cedera kepala traumatik mengalami peningkatan NSE dan menariknya pemberian dengan MLC 901 1 jam setelah cedera kepala traumatik pada model hewan tersebut mencegah peningkatan serum NSE. Hasil ini menunjukkan efek positif dari MLC 901 baik pada tikus yang mengalami cedera korda spinalis dan pada tikus setelah cedera kepala traumatik dengan mengurangi konsekuensi merusak yang disebabkan oleh cedera tersebut (Quintard et al., 2014).

Penelitian ini menjelaskan terjadi perbedaan persentase kerusakan pada kedua kelompok setelah cedera korda spinalis. Hal ini serupa dengan penelitian mengenai, volume infark pada tikus yang mengalami *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) dan telah diberikan MLC 901 selama 5 minggu sebelumnya, terlihat lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok *vehicle*. Selain itu

kelompok yang diobati juga terlihat mengalami penurunan edema otak yang signifikan dibandingkan dengan kelompok *vehicle* (Heurteaux et al., 2013; Ranuh et al., 2021). Selain itu MLC901 juga mengurangi volume infark otak dan memberikan efek neuroprotektif beberapa saat setelah cedera otak iskemik akut (Ranuh et al., 2021).

Penelitian ini membuktikan bahwa tindakan klip kompresi pada korda spinalis model tikus, akan mengakibatkan cedera berat pada korda spinalis hewan tersebut. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Poon et al, menunjukkan *clip compression* pada korda spinalis setinggi T2 dengan kekuatan 20, 26, dan 35 g menghasilkan penurunan skor BBB. Penurunan skor BBB terendah dialami pada kelompok tikus yang mengalami kompresi pada korda spinalis dengan kekuatan 35 g disusul oleh kelompok tikus dengan kekuatan kompresi sebesar 26 g dan 20 g. Selain itu, clip compression yang dilakukan oleh pada korda spinalis tikus setinggi C6 dengan kekuatan kompresi 18 g menghasilkan penurunan lebih dari setengah nilai skor BBB bila dibandingkan kelompok kontrol yang hanya dilakukan laminektomi (Forgione et al., 2014; Poon et al., 2007).

Penelitian ini membuktikan bahwa tindakan klip kompresi pada korda spinalis model tikus, akan mengakibatkan cedera berat pada korda spinalis hewan tersebut. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Poon et al, menunjukkan *clip compression* pada korda spinalis setinggi T2 dengan kekuatan 20, 26, dan 35 g menghasilkan penurunan skor BBB. Penurunan skor BBB terendah dialami pada kelompok tikus yang mengalami kompresi pada korda spinalis dengan kekuatan 35 g disusul oleh kelompok tikus dengan kekuatan kompresi sebesar 26 g dan 20 g. Selain itu, clip compression yang dilakukan oleh pada korda spinalis tikus setinggi C6 dengan kekuatan kompresi 18 g menghasilkan penurunan lebih dari setengah nilai skor BBB bila dibandingkan kelompok kontrol yang hanya dilakukan laminektomi (Forgione et al., 2014; Poon et al., 2007).

## **BAB 6**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, dapat ditarik suatu kesimpulan yakni, pada penelitian ini ditemukan bahwa MLC901 memperbaiki fungsi lokomotor dan menurunkan prosentase kerusakan jaringan korda spinalis pada tikus dengan cedera korda spinalis melalui penghambatan peningkatan kadar VEGF dan mempertahankan kadar VEGF untuk fungsi angiogenesis dan neuroprotektifnya serta melalui penghambatan peningkatan kadar NSE.

#### **6.2 Saran**

Berdasarkan hasil kajian secara keseluruhan penelitian ini maka saran dari penelitian ini adalah :

1. Penelitian lebih lanjut tentang peran MLC 901 dalam meregulasi faktor faktor terkait proses cedera korda spinalis, dalam rangka mendapatkan data acuan penggunaan MLC 901 terutama pada manusia.
2. Penelitian lebih lanjut tentang perbandingan MLC 901 dengan terapi lain dalam penanganan cedera korda spinalis.