

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Cedera medulla spinalis dan cedera otak merupakan bagian dari cedera sistem saraf pusat. Cedera medulla spinalis adalah cedera pada tulang belakang baik langsung maupun tidak langsung yang menyebabkan lesi di medulla spinalis sehingga menimbulkan gangguan neurologis dan dapat menyebabkan kecacatan permanen atau bahkan kematian. Gangguan fungsional sebagai akibat dari CMS dapat berdampak secara signifikan terhadap kehidupan penderita, sehingga diperlukan upaya untuk menemukan pengobatan yang lebih baik terhadap kondisi tersebut agar mampu meningkatkan kualitas hidup pasien (Alizadeh et. al. 2019; Bennet et al. 2022)

Menurut data dari WHO, setiap tahunnya insiden cedera medulla spinalis terjadi sekitar 250.000 – 500.000 dari seluruh dunia (WHO, 2013). Kelompok usia yang paling sering menderita CMS adalah dari kelompok usia dewasa, khususnya di negara berkembang, antara rentang usia 29 sampai dengan 46 tahun. Dari distribusi kejadian CMS terjadi pada usia 15-29 tahun dan puncaknya usia diatas 65 tahun. Dari kelompok jenis kelamin, CMS empat kali lipat lebih rentan terjadi pada laki-laki dibandingkan dengan perempuan. Di Negara Berkembang, angka kematian CMS mencapai 1,4% hingga 20%, khususnya pada kelompok usia 60 tahun ke atas. Jika dilihat dari durasi patologinya, mortalitas CMS paling sering terjadi pada kurun waktu

satu tahun dari onset, baik berupa cedera komplisit dan cedera pada area servikal. Cedera komplisit terjadi jika pasien kehilangan seluruh fungsi sarafnya (baik motorik, sensorik atau otonom) pada level cedera sampai di bawah lesi. Selain itu, digolongkan cedera inkomplit jika pasien masih memiliki beberapa fungsi saraf yang berperan normal (Kang et. al. 2018).

Pada cedera primer, mekanisme Patomekanisme CSM melibatkan kompresi pada medulla spinalis dan kerusakan mekanik, yang dilanjutkan dengan inisiasi kaskade biokimia dan proses seluler yang dikenal sebagai cedera sekunder pada sel glia dan neuron (Abbaszadeh et. al, 2020). Terjadinya cedera sekunder dapat memperberat kerusakan mekanik dan kimiawi hingga daerah sekitar lesi pada medulla spinalis. Hal ini ditandai dengan kaskade progresif termasuk proses edema jaringan, oksidatif, inflamasi, eksitotoksisitas saraf yang dimediasi glutamat, pembentukan radikal bebas, apoptosis, nekrosis dan autofagi (Abbaszadeh et al. 2020; Anjum et al. 2020).

Aquaporin-4 (AQP-4) merupakan aquaporin yang terdiri dari enam domain transmembrane heliks dan dua motif ASN-pro-ALA (NPA) yang sangat terkonservasi. Utamanya diekspresikan dalam jaringan medulla spinalis hewan pengerat dan manusia serta memerankan peran utama dalam proses patologis setelah CMS terjadi. Setelah CMS terjadi, edema, jaringan parut glial dan inflamasi dapat mempercepat progress dari cedera dan berpengaruh pada menurunnya fungsi neurologis. Pada beberapa penelitian melaporkan bahwa AQP-4 memiliki peran penting dalam CMS. Secara khusus, AQP-4 dalam proses patologis sekunder (edema medulla spinalis, pembentukan jaringan parut glial dan respon inflamasi)

paska terjadinya CMS (Qi-Lin Pan et al. 2021).

Beberapa penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa hilangnya AQP-4 dikaitkan dengan berkurangnya edema medulla spinalis dan perbaikan prognosis setelah CMS pada hewan percobaan khususnya tikus dilakukan. Selain itu, penurunan regulasi AQP-4 mengurangi pembentukan jaringan parut glial dan respon inflamasi setelah CMS. Terdapat beberapa penelitian bahwa AQP-4 memungkinkan menjadi target potensial khususnya pada terapi CMS, yang juga dapat menjadi panduan pada penelitian yang berkesinambungan untuk terapi molekuler CMS. Pada penelitian ini akan ditinjau struktur dan ekspresi AQP-4 pada medulla spinalis yang normal dan yang telah diinduksi CMS derajat berat yang diharapkan dapat memberikan gambaran terkait peranan AQP-4 dalam proses penyembuhan pasien CMS (Nagelhus et al. 2013).

Malondialdehid (MDA) adalah senyawa dialdehid yang merupakan produk akhir peroksidasi lipid dalam tubuh, melalui proses enzimatik atau nonenzimatik. Peroksidasi lipid merupakan mekanisme kerusakan sel yang terlibat dalam banyak pathogenesis penyakit, termasuk CMS. Peroksidasi lipid juga dianggap sebagai salah satu efek *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang paling merusak pada CMS (Jia et al, 2012). Dalam rangka perlindungan terhadap serangan ROS, tubuh manusia memiliki suatu sistem antioksidan yang terorganisir, baik antioksidan enzimatik maupun antioksidan nonenzimatik, yang bekerja secara sinergis. Antioksidan melindungi sel tubuh terhadap kerusakan oksidatif dan dapat mencegah produksi dari produk– produk oksidatif. Ketidakseimbangan antara oksidan dan

antioksidan, yaitu jika produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan, berpotensi menyebabkan kerusakan, yang disebut dengan stres oksidatif (Jia et al. 2012; Cheignon et al. 2018).

Aldehida telah terbukti sangat reaktif dan menjadi produk akhir dari peroksidasi lipid pada CMS. Konsentrasi MDA yang tinggi menunjukkan adanya proses oksidasi dalam membran sel. Pada beberapa study sebelumnya juga menunjukkan bahwa aldehida terlibat secara kausal dalam efek patomekanisme yang berkaitan dengan stres oksidatif pada CMS (Kinasih dkk, 2018). Di antara biomarker (penanda) stres oksidatif, yang paling sering digunakan sebagai parameter laboratorium adalah peroksidase lipid dan protein karbonilasi. Penanda tersebut dapat ditemukan dalam darah, urin dan cairan biologis lainnya yang dapat memberikan nilai diagnostik (Jia et al. 2012).

Sel SSP manusia diketahui memiliki respon neuroprotektif dan regeneratif yang sangat terbatas dan dapat mencegah terjadinya penyembuhan total setelah cedera (Tansey dan Kakulas. 2012). Pemahaman yang lebih baik tentang perubahan patologis CMS pada tingkat molekuler dapat memperluas pengembangan terapi farmakologis yang bertujuan untuk meningkatkan hasil pengobatan dan proses penyembuhan jaringan pasca CMS (Heurteaux et al. 2013).

Moleac (MLC) 901 adalah fitofarmaka hasil penyempurnaan dari MLC601 (juga dikenal sebagai *Danqi Piantang Jiaonang*). Penelitian menunjukkan bahwa kombinasi bahan aktif dalam MLC901 mengandung molekul penting yang mampu menciptakan kondisi mikro yang memfasilitasi amplifikasi dan diferensiasi serabut

saraf progenitor (Cao et al. 2022). Selain itu, disebutkan juga bahwa MLC901 banyak digunakan dalam pemulihan stroke. Beberapa penyelidikan eksperimental dan klinis telah menunjukkan kemanjuran MLC901 pada pasien stroke. Perawatan MLC901 membantu menghasilkan jaringan arborisasi dan akson dendritik yang lebih kompleks, serta pertumbuhan dan percabangan neurit dalam penyelidikan isolasi sel korteks serebral pasca-stroke (Heurteaux et al. 2010; Maati et al. 2012). Pemberian MLC901 pada hewan percobaan menggunakan model stroke menunjukkan kemampuannya dalam meningkatkan kemampuan alami otak untuk neuroplastisitas, selain karakteristik neuroprotektif, neurogenesis, dan kemampuan untuk memperluas sinapsis. Pemberian MLC901 pada tikus selama tujuh hari berturut-turut meningkatkan kinerja motorik secara signifikan (Heurteaux et al. 2013). Pemberian MLC901 juga diberikan sebagai terapi tambahan pada kasus neurotrauma, demensia, dan nyeri kronis juga sedang diteliti. (Fauzi et al. 2020; Rosyidi et al. 2020; Kusuma et al. 2022).

The Spinal Cord Injury-Assessing Tolerability and Use of Combined Rehabilitation and NeuroAiD/SATURN study mengungkapkan penelitian awal terhadap subjek manusia tentang pemberian MLC901 pada CMS yang berat, dengan hasil yang menunjukkan bahwa pemberian MLC901 aman dan cenderung bermanfaat dalam meningkatkan hasil dan fungsi motorik penderita (Kumar et al., 2022). Pada penelitian (Wahyudi et al. 2022) yang menggunakan tikus percobaan menemukan bahwa pemberian MLC901 kepada pasien dengan CMS berat dapat mengurangi permeabilitas pembuluh darah medulla spinalis. Dampak neuroprotektif dihasilkan melalui pengurangan permeabilitas vaskular dengan menurunkan

ekspresi dan level VEGF dalam sirkulasi darah.

Teknik pengobatan untuk neuroproteksi terhadap proses neurodegeneratif pasca-CMS telah dikembangkan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menciptakan obat farmakologis baru yang akan meningkatkan perbaikan saraf dan hasil terapi. Hasil tertentu yang berhasil mungkin saja terjadi, tetapi tidak menjamin kesembuhan pasien. Diperkirakan sebagai akibat dari mekanisme penyembuhan CMS yang rumit dan keterlibatan mekanisme protektif (Anjum et al. 2020). Studi biomolekul saat ini menunjukkan bahwa enam dari sembilan komponen aktif MLC901 telah terbukti secara langsung berguna dalam beberapa mekanisme Patomekanisme CMS, khususnya peranan dalam proses antioksidan, inflamasi, apoptosis dan mikrosirkulasi. (Fu et al. 2013; Zhang et al. 2017; Huang et al. 2022).

Sampai dengan saat ini belum dikembangkan penelitian yang menilai efektifitas dari MLC901 pada CMS di jalur inflamasi dan gliosis. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian MCL901 sebagai ajuvan penyembuhan fungsi motoric melalui perubahan ekspresi Aquaporin-4 dan Malondialdehyde (MDA) serta gambaran histopatologis pada tikus wistar yang telah diinduksi CMS derajat berat.

1.2 Rumusan Masalah

Insiden cedera medulla spinalis terjadi cukup tinggi dan dapat menimbulkan gangguan neurologis berupa kecacatan permanen atau bahkan kematian. Diperlukan pengobatan yang lebih efektif dan efisien agar dapat meminimalisir kecacatan dan memaksimalkan pemulihan fungsional.

Mekanisme Patomekanisme CSM yang memperburuk cedera primer adalah cedera sekunder pada sel glia atau neuron yang mampu memperberat kerusakan jaringan disekitar lesi medulla spinalis, setidaknya, melalui 2 proses yakni: stress oksidatif dan proses inflamasi. Proses oksidatif yang menyertai adalah pembentukan radikal bebas oksigen yang akan merusak jaringan terutama membran sel saraf sehingga permeabilitas membrane sel meningkat dan terbentuknya MDA di cairan ekstraselluler, menimbulkan edema dan kematian sel saraf. Proses inflamasi menghancurkan jaringan saraf dan menghambat aktivitas oligodendrosit, menghasilkan protease dan RBO untuk menghambat perbaikan saraf. Sedangkan (AQP-4) diekspresikan dalam jaringan medulla spinalis yang mengalami cedera dan berperan penting dalam proses cedera sekunder. Hilangnya AQP-4 dikaitkan berkurangnya edema, pembentukan jaringan parut glial dan respon inflamasi.

Beberapa penyelidikan eksperimental dan klinis telah menunjukkan MLC901, yang mengandung beberapa bahan aktif dapat meningkatkan aktivitas SOD, sehingga menurunkan pembentukan RBO, menurunkan MDA, menekan aktivasi mikroglia dan respon imun. Selain itu juga menghambat inflamasi dan apoptosis serta mempercepat pemulihan fungsi saraf. Pemberian MLC901 pada hewan coba model stroke dapat meningkatkan neuroplastisitas, selain sebagai neuroprotektif, neurogenesis juga meningkatkan sinapsis.

Oleh karena itu, masalah penelitian ini adalah apakah pemberian MLC901 dapat

mengurangi kerusakan jaringan medulla spinalis dan mempercepat perbaikan fungsi motorik pada tikus Wistar yang telah diinduksi cedera medulla spinalis derajat berat. Termasuk bagaimana proses mekanismenya; apakah mampu berperan untuk menurunkan AQP-4 sehingga proses inflamasi dan stress oksidatif menurun.

Pertanyaan penelitian:

1. Apakah pemberian MLC901 menekan kenaikan ekspresi mRNA AQP4 jaringan medula spinalis pada tikus wistar yang telah diinduksi cedera medula spinalis derajat berat?
2. Apakah pemberian MLC901 menekan kenaikan kadar MDA jaringan medula spinalis pada tikus wistar yang telah diinduksi cedera medula spinalis derajat berat?
3. Apakah derajat gambaran kerusakan jaringan medula spinalis yang diberikan MLC901 lebih ringan daripada kontrol pada tikus wistar yang telah diinduksi cedera medula spinalis derajat berat?
4. Apakah derajat luaran fungsi motorik lebih tinggi (baik) tikus yang diberikan MLC901 daripada kontrol pada tikus Wistar yang telah diinduksi cedera medulla spinalis derajat berat?
5. Apakah ada korelasi ekspresi mRNA AQP-4, kadar MDA dan derajat kerusakan jaringan medulla spinali pada tikus Wistar yang telah diinduksi cedera medulla spinalis derajat berat?
6. Apakah ada korelasi ekspresi mRNA AQP-4, kadar MDA, derajat kerusakan

jaringan medulla spinali dan derajat luaran fungsi motorik pada tikus Wistar yang telah diinduksi cedera medulla spinalis derajat berat?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini antara lain untuk dibuktikan pengaruh pemberian MLC901 pada tikus wistar yang telah diinduksi cedera medula spinalis derajat berat dalam mengurangi kerusakan jaringan medula spinalis dan pengaruhnya terhadap perbaikan fungsi motorik serta mekanismenya dalam mengurangi proses inflamasi dan stress oksidatif.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Dibuktikan bahwa pemberian MLC901 menekan kenaikan ekspresi mRNA AQP-4 jaringan medulla spinalis pada tikus Wistar yang telah diinduksi cedera medulla spinalis derajat berat.
2. Dibuktikan bahwa pemberian MLC901 menekan kenaikan kadar MDA jaringan medulla spinalis pada tikus Wistar yang telah diinduksi cedera medulla spinalis derajat berat.
3. Dibuktikan bahwa derajat gambaran kerusakan jaringan medulla spinalis yang diberikan MLC901 lebih ringan daripada kontrol pada tikus Wistar yang telah diinduksi cedera medulla spinalis derajat berat.
4. Dibuktikan bahwa derajat luaran fungsi motorik lebih tinggi tikus yang diberikan MLC901 daripada kontrol pada tikus Wistar yang telah diinduksi cedera medulla spinalis derajat berat.

5. Dibuktikannya korelasi ekspresi mRNA AQP-4, kadar MDA dan derajat kerusakan jaringan medulla spinali pada tikus Wistar yang telah diinduksi cedera medulla spinalis derajat berat.
6. Dibuktikannya korelasi ekspresi mRNA AQP-4, kadar MDA, derajat kerusakan jaringan medulla spinalis dan derajat luaran fungsi motorik pada tikus Wistar yang telah diinduksi cedera medulla spinalis derajat berat.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Akademik

Secara teoritis penelitian ini dapat memberikan manfaat, antara lain:

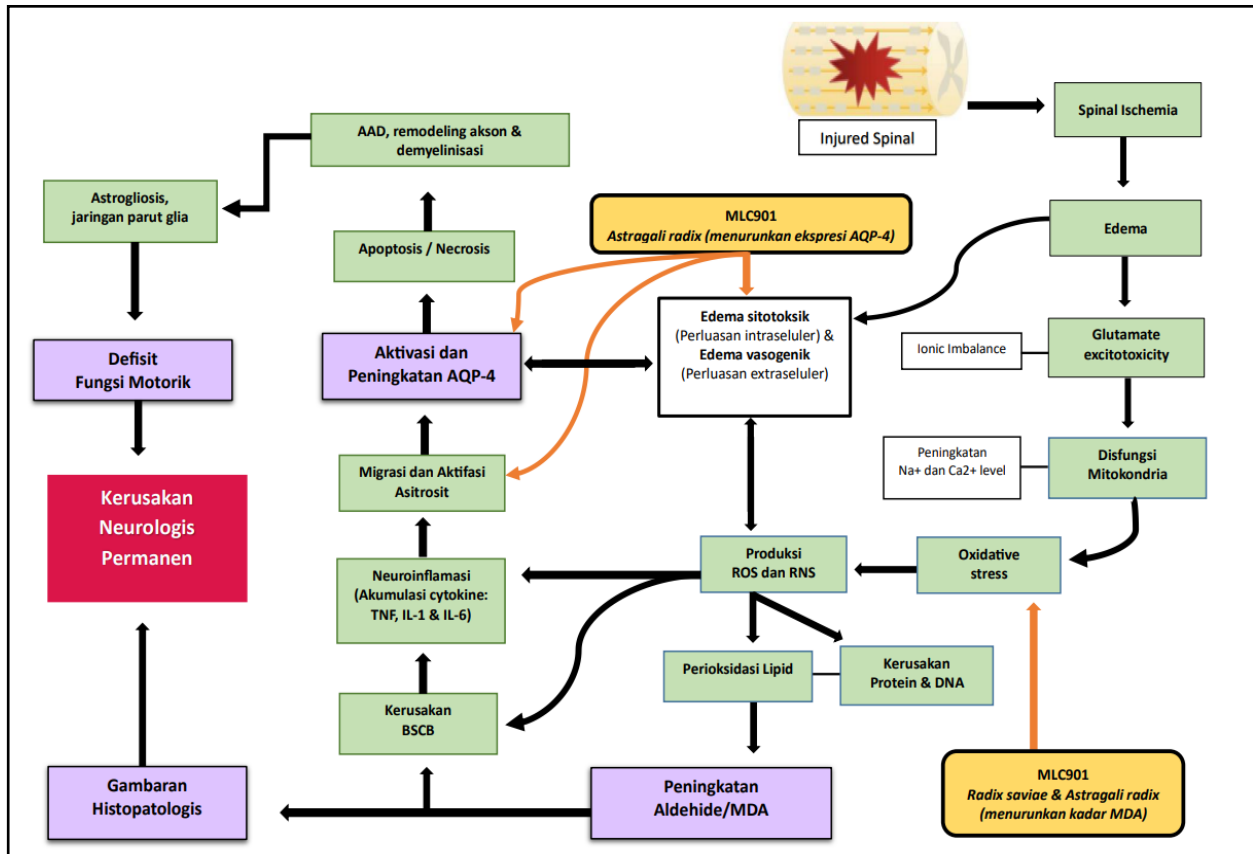
1. Memberikan data dan informasi teoritis terkait pengaruh pemberian MLC901 pada tikus wistar yang terinduksi CMS kronis derajat berat terhadap proses respon inflamasi, gliosis, gambaran histopatologis medulla spinalis dan fungsi motorik.
2. Memberikan gambaran terkait hasil terapi farmakologi terbaru dalam penanganan kerusakan jaringan sebagai dampak dari CMS derajat berat.
3. Menjadi acuan ilmiah tentang fitofarmaka dan mekanisme patologis yang memberi pengaruh terhadap fungsi motorik pada CMS derajat berat, khususnya untuk penelitian-penelitian selanjutnya.

1.4.2. Manfaat Praktis

1. Hasil dari penelitian ini tentang potensi MLC901 terhadap pemulihan CMS derajat berat dengan mekanisme respon inflamasi, gliosis, gambaran histopatologis medulla spinalis dan fungsi motorik, diharapkan mampu menjadi salah satu acuan terhadap pemberian fitofarmaka berbahan dasar aktif MLC901 melalui tahapan penelitian yang lebih lanjut bahkan penerapan uji klinis terhadap manusia.

1.5 Kerangka Teori

Dari hasil kajian pustaka pada bab sebelumnya, maka masalah penelitian dapat disimpulkan dengan kerangka teori sebagai berikut.



Gambar 1.1

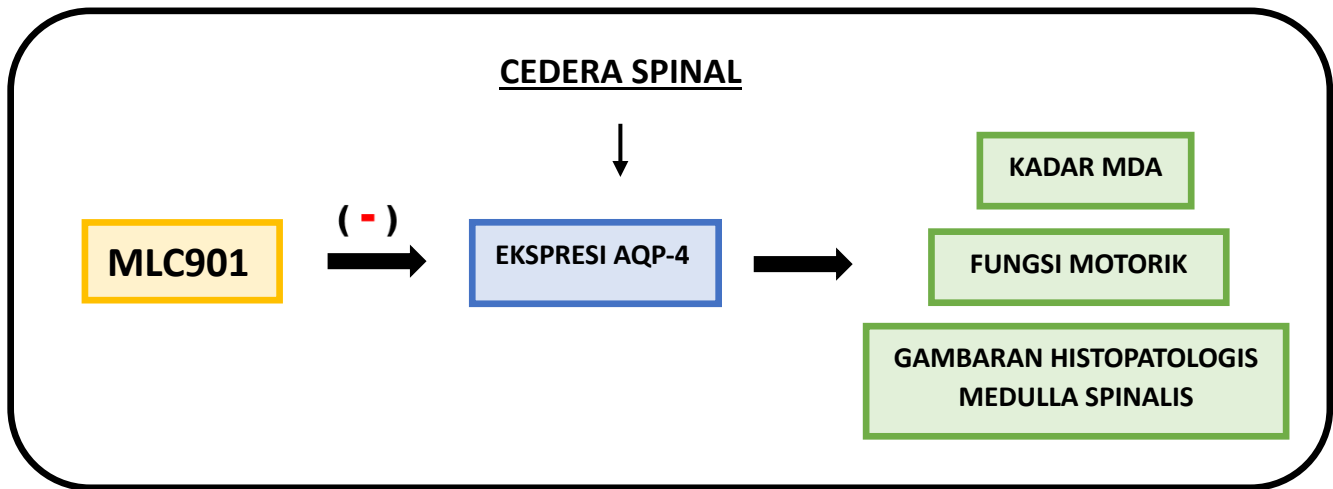
Struktur Kerangka Teori Penelitian

Keterangan:

- = Jalur patomekanisme CMS
- = Target penelitian
- = Jalur pengaruh MLC 901

1.6 Konsep Penelitian

Adapun kerangka konsep dari penelitian ini dapat digambarkan sebagai berikut.



Gambar 1.2

Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

- : Variabel Independen
- : Variabel Antara
- : Variabel Dependen

1.7 Hipotesis

Dari kerangka teori dan konsep yang sebelumnya telah dijelaskan, maka terdapat beberapa hipotesis yang dapat disusun dari penelitian ini, antara lain:

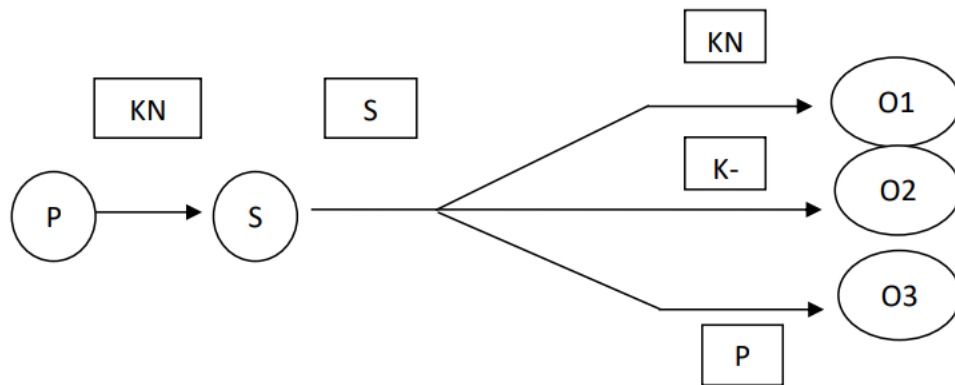
1. Pemberian MLC901 menekan kenaikan ekspresi mRNA AQP-4 jaringan medulla spinalis pada tikus wistar yang telah diinduksi cedera medulla spinalis derajat berat.
2. Pemberian MLC901 menekan kenaikan kadar MDA jaringan medulla spinalis pada tikus wistar yang telah diinduksi cedera medulla spinalis derajat berat.
3. Derajat gambaran kerusakan jaringan medula spinalis yang diberikan MLC901 lebih ringan daripada kontrol pada tikus wistar yang telah diinduksi cedera medula spinalis derajat berat.
4. Derajat luaran fungsi motorik lebih tinggi pada tikus yang diberikan MLC901 daripada kontrol pada tikus wistar yang telah diinduksi cedera medula spinalis derajat berat.
5. Terdapat korelasi antara ekspresi mRNA AQP-4 dengan kadar MDA dan derajat kerusakan jaringan medula spinalis pada tikus wistar yang telah diinduksi cedera medula spinalis derajat berat.
6. Terdapat korelasi antara ekspresi mRNA AQP-4, kadar MDA, derajat kerusakan jaringan medula spinalis dan derajat luaran fungsi motorik pada tikus wistar yang telah diinduksi cedera medula spinalis derajat berat.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental dengan desain Randomized post-test only control group design*. Rancangan penelitian dijabarkan pada Gambar 2.1 berikut:



Gambar 2.1

Rancangan *The Randomized Post-test Only Control Group*

Keterangan:

P : Populasi

S : Sampel

RS : Random Sampling

RA : Random Alokasi

KN : Kelompok normal (subjek dilakukan pembedahan laminektomi)

tanpa induksi cedera medulla spinalis derajat berat, selanjutnya disebut Kelompok 1.

K- : Kelompok kontrol negatif (subjek menerima induksi cedera medulla spinalis derajat berat, selanjutnya disebut Kelompok 2)

P : Kelompok perlakuan (subjek menerima induksi cedera medulla spinalis derajat berat dan perlakuan berupa pemberian MLC901, selanjutnya disebut Kelompok 3)

O1 : *Post-test* Kelompok 1

O2 : *Post-test* Kelompok 2

O3 : *Post-test* Kelompok 3

Post-test adalah hasil observasi berupa ekspresi AQP-4, Kadar MDA, gambaran histopatologis dan fungsi motorik pada hari ketujuh.

2.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilaksanakan di laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin, Makassar. Persiapan dan perlakuan pada hewan coba berlokasi di Laboratory Animal Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin. Pemeriksaan imunohistokimia dilaksanakan di laboratorium Patologi Anatomi, Rumah Sakit Universitas Hasanuddin. Pemeriksaan ELISA dilakukan di laboratorium Patologi Klinik Rumah Sakit Universitas Hasanuddin. Penelitian ini dilakukan selama bulan juli hingga desember 2024.

2.3 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup dari penelitian ini adalah Ilmu Kedokteran Biomedik dengan area Ilmu Bedah Saraf.

2.4 Penentuan Sumber Data

2.4.1 Populasi Target

Populasi target dalam penelitian ini adalah seluruh tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan.

2.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau pada penelitian ini adalah tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) jantan berusia dua hingga tiga bulan yang dipelihara di Laboratory Animal Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin serta sesuai dengan kriteria sampel yang telah ditentukan dalam penelitian.

2.4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini menggunakan tikus Wistar dewasa yang memenuhi kriteria inklusi.

2.4.4 Kriteria Inklusi

1. Tikus Wistar jantan, sehat.
2. Tikus berusia dua hingga tiga bulan.
3. Berat badan 150-200 gram

2.4.5 Kriteria drop out

1. Tikus mengalami infeksi luka operasi selama penelitian
2. Tikus yang mati selama penelitian dilaksanakan.

2.4.6 Besar Sampel

Berdasarkan referensi Arifin dan Zahiruddin (2017), penelitian ini menggunakan pendekatan dengan rumus resource equation berdasarkan rentang nilai degrees of freedom/DF yang dapat diterima pada Analysis of Variance/ANOVA nilainya antara minimal 10 hingga maksimal 20. Pendekatan DF menghasilkan rumus nilai minimum dan maksimum sampel penelitian.

$$n = DF/k + 1$$

n = jumlah sampel minimum/maksimum per kelompok

DF = degrees of freedom

k = jumlah kelompok dalam penelitian

Perhitungan jumlah sampel minimum dengan nilai DF 10, sebagai berikut:

$$n = 10/k + 1$$

$$n = 10/3 + 1 = 4,3 \sim \text{dibulatkan } 5 \text{ hewan coba per kelompok.}$$

Perhitungan jumlah sampel maksimum dengan nilai DF 20, sebagai berikut:

$$n = 20/k + 1s$$

$$n = 20/3 + 1 = 7,7 \sim \text{dibulatkan } 8 \text{ hewan coba per kelompok.}$$

Jumlah hewan coba yang diperlukan sebanyak minimal 15 dan maksimal 24. Penelitian ini memperhitungkan kemungkinan drop out 10%, sehingga menggunakan jumlah hewan coba sebanyak enam pada masing-masing kelompok. Jumlah total sampel yang dibutuhkan adalah 18 ekor tikus.

2.4.7 Teknik Pengambilan Sampel

Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Dilakukan pemilihan secara random pada populasi tikus berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi untuk menentukan 30 ekor tikus yang akan dijadikan sampel penelitian.
2. Seluruh sampel hewan coba yang telah memenuhi syarat kemudian secara random dibagi menjadi tiga kelompok, antara lain:

- a. Kelompok kontrol normal (1)
- b. Kelompok kontrol negatif (2)
- c. Kelompok perlakuan (3)

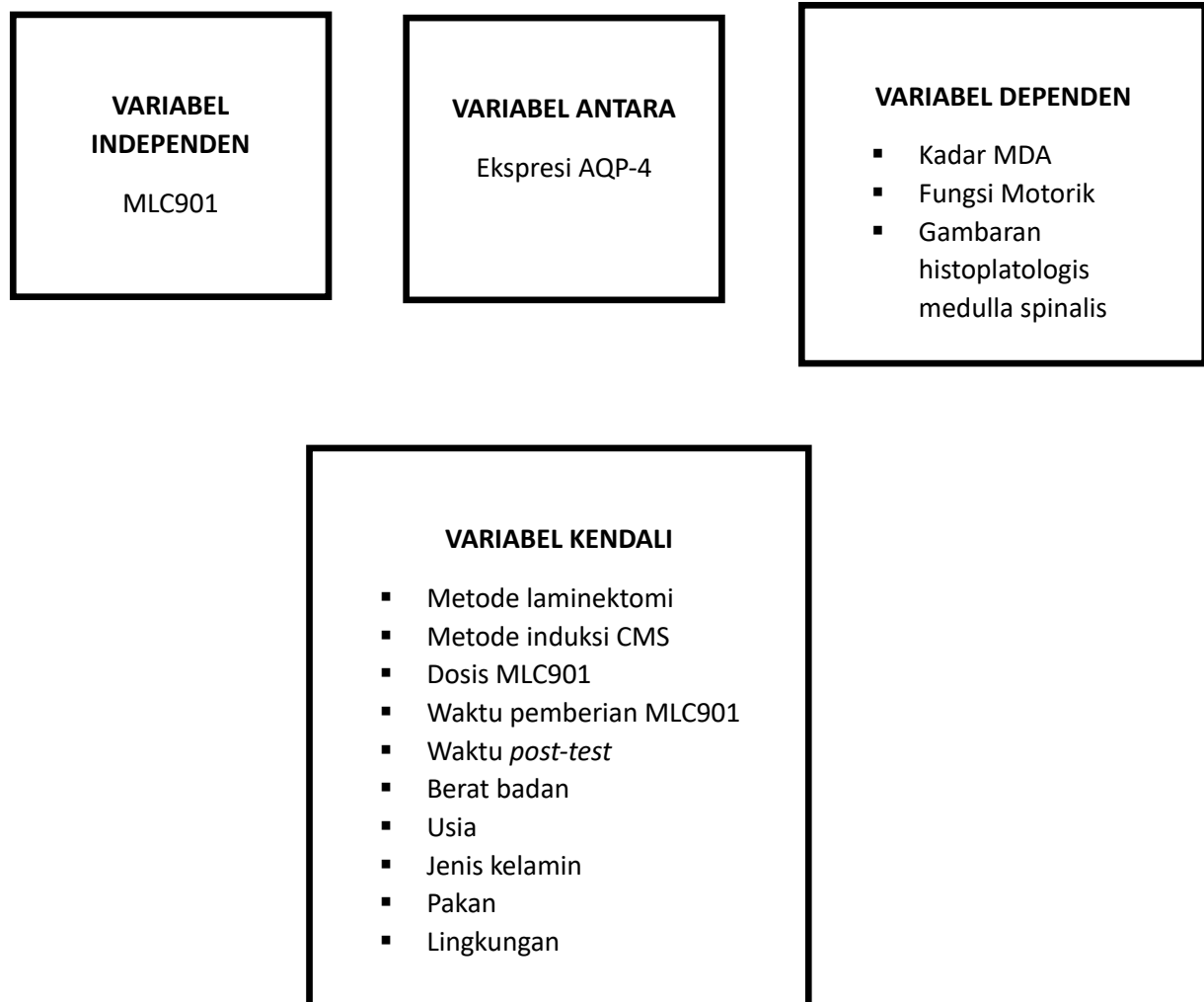
2.5 Variabel Penelitian

2.5.1 Identifikasi Variabel

- a. Variabel bebas: Pemberian MLC901
- b. Variabel tergantung: ekspresi AQP-4, kadar MDA, gambaran histopatologi medula spinalis, dan fungsi motorik.
- c. Variabel kendali: metode laminektomi, metode induksi CMS, dosis MLC901, waktu pemberian MLC901, waktu post-test, strain, berat badan, usia, jenis kelamin, pakan (nutrisi) tikus Wistar, lingkungan (jenis kandang, waktu pemberian makan, lingkungan kandang).

2.5.2 Hubungan Antar Variabel

Hubungan antar variabel dalam penelitian ini digambarkan pada skema berikut:



Gambar 2.2

Skema Hubungan Antar Variabel

2.5.3 Definisi Operasional Variabel

- a. MCL901 mengandung sembilan bahan herbal alami, antara lain: Astragali radix (AR), Radix salviae miltorrhizae (RSM), Radix paeoniae rubra (RPR), Rhizoma chuanxiong (RC), Angelicae sinensis radix (ASR), Carthamus tinctorius (CT), Prunus persica (PP), Radix polygalae (RP), dan Rhizoma acori tatarinowii (RAT) (Ranuh et al. 2021). Pemberian MLC901 dilakukan melalui oral dengan cara sonde dan total dosis 248mg/kgBB/hari (volume per harinya sebanyak 1,5 ml dengan konsentrasi larutan 33,33 mg.ml). Terapi tetap dilanjutkan setiap harinya hingga hewan coba tikus dikorbankan pada hari ke tujuh.
- b. Induksi yang dilakukan pada hewan coba tikus adalah cedera medula spinalis derajat berat dengan tipe kontusio. Mekanismenya dengan menjatuhkan beban seberat 10 gr dari ketinggian 50 mm secara bebas ke medula pada level Torakal 10 yang telah terekspos dengan metode operasi laminektomi (Verma et al. 2019).
- c. Jaringan medulla spinalis diambil dengan cara eksisi kurang lebih 1 cm dari bagian torakal pada 18 tikus wistar dengan area induksi yang berada di tengahnya. Jaringan tersebut disimpan di dalam botol yang kemudian direndam dengan menggunakan

buffer formalin 40%. Untuk pemeriksaan ekspresi AQP-4, kadar MDA dan gambaran histopatologis, jaringan medula spinalis dipotong melintang untuk memudahkan pemeriksaan.

- d. Ekspresi AQP-4 adalah hasil mRNA AQP-4 pada jaringan medula spinalis yang dinilai dengan jumlah sel positif pada sitoplasma yang berwarna coklat dibagi jumlah seluruh sel menggunakan kit *Universal Biologicals*, sesuai dengan instruksi yang terdapat pada buku petunjuk. Satu kit dapat menganalisis seluruh sampel sesuai dengan kebutuhan sampel penelitian.
- e. Kadar MDA adalah hasil immunohistokimia MDA pada jaringan medula spinalis yang dinilai dengan jumlah sel positif pada sitoplasma yang berwarna coklat dibagi jumlah seluruh sel.
- f. Gambaran histopatologis merupakan analisis terhadap perubahan struktur histologis medula spinalis pada hewan coba yang diinduksi CMS derajat berat. Preparat histopatologi diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali dan dicatat perubahan yang ditemukan pada lima lapang pandang. Perubahan yang diamati adalah adanya degenerasi melemak, kongesti, nekrosis, dan infiltrasi sel radang. Preparat histopatologi diamati dan dilakukan skoring untuk mendapatkan data kuantitatif. Sistem

skoring yang digunakan yaitu: Skor 0 = tidak ada kerusakan histopatologi; Skor 1 = ada kerusakan bersifat fokal (ringan); Skor 2 = ada kerusakan bersifat multifokal (sedang); Skor 3 = ada kerusakan bersifat difusa (berat).

- g. Fungsi motorik tikus adalah lokomotor yang diukur berdasarkan skala BBB. Penguji melakukan sesi pengujian selama empat menit menggunakan skala peringkat BBB setelah seekor tikus berjalan terus menerus di area terbuka. Hasil yang didapatkan berbentuk numerik (0-21) (Basso et al. 1996).
- h. *Rattus norvegicus* / tikus putih jantan adalah tikus jantan galur wistar dengan ciri anatomis tikus dan dalam keadaan sehat sesuai ketetapan dari dokter hewan. Hewan coba tikus wistar berusia dua sampai tiga bulan dengan berat badan 150-200 gram, bergerak aktif, rambut tidak rontok dan mendapatkan asupan makanan yang cukup.
- i. Seluruh tikus ditimbang berat badannya menggunakan alat timbang analitik skala digital, merek Mittlet PJ 400 buatan Jepang dengan kapasitas maksimal dua kilogram. Berat badan tikus pada penelitian ini dinyatakan dalam satuan gram (g).
- j. Pakan tikus terdiri dari protein 20-25%, karbohidrat 45-55%, lemak 10-12% dan serat kasar 4% sesuai dengan formula

standar yang dianjurkan oleh dokter hewan.

- k. Kondisi kandang dibuat dalam kondisi yang nyaman sehingga tidak memicu stress pada hewan percobaan. Setiap hewan coba ditempatkan dalam kandangnya masing-masing dengan keadaan gelap untuk menghindari hipertermia dan stress.

2.6 Bahan Penelitian

Terdapat beberapa bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: MLC901, tikus jantan galur Wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram, pakan tikus standar, etamine dan xylazine untuk anestesi, kit ELISA (Rat Aquaporin 4 ELISA Kit (AQP4) 96T, UNIVERSAL BIOLOGICALS), Pengecatan MDA mempergunakan Genetex Malondialdehyde antibodi 50 uL GTX12835_50 uL, kit antibodi sekunder Dako EnVision®+ Dual Link System- HRP (DAB+), PBS 1X, dH₂O, tip filtered 10 ul, 200 ul, 1000 ul, tabung Eppendorf, tabung conical 50 ml, FBS, proteinase K, etanol 70%, 95%, 100%, xylene, entellan, slide Poly-lysine, paraplast, buffer Formalin fosfat, blade Leica, hematoxilin Meyer, dan TE buffer.

2.7 Instrumen Penelitian

Instrumen dalam penelitian ini antara lain: kandang tikus dari plastik yang berisi sekam, tempat makanan, botol minuman dan ditutup dengan kawat dengan ukuran 40 cm x 15 cm x 10 cm sebanyak 30 buah, timbangan digital, microtome Jung Leica 820 Histocut, mikroskop Olympus CX 41,

kamera OptilabPro, staning Jar, micropipette, inkubator Falc, dan microwave Samsung.

2.8 Prosedur dan Alur Penelitian

2.8.1 Pemeliharaan Tikus

Tikus wistar yang digunakan pada penelitian ini berumur dua sampai tiga bulan dengan berat badan 150-200 gram dan dinyatakan sehat secara fisik, memiliki gerak yang lincah, tidak lesu, mata terang tidak sayu dan kulit bersih tanpa luka. Hewan coba tikus ditimbang dan ditempatkan dalam kandangnya masing-masing serta dibebaskan hanya saat keperluan makan dan minum. Aklimatisasi hewan coba terhadap lingkungannya dilakukan selama satu minggu sebagai pelaksanaan awal penelitian. Lingkungan penelitian dipastikan dalam kondisi aman, bersih, kering dan memiliki sirkulasi udara yang baik. Kandang hewan coba terbuat dari plastik dan berisi alat untuk makan dan minum. Hewan coba diberikan makan dan minum setiap 12 jam sekali. Keadaan kandang dibuat dalam keadaan gelap dengan suhu ruangan yang diatur pada $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban $50 \pm 10\%$.

Selain itu dilakukan juga pengawasan status kesehatan dari hewan coba seperti alas kandang yang diganti secara berkala serta pencacatan hewan coba yang mati. Pengawasan petugas pemeliharaan hewan dilakukan dengan membatasi masuknya orang

ke daerah penempatan kandang, membuat laporan berat badan tikus, laporan jumlah asupan hewan coba, melacak ciri hewan coba yang tidak sehat, stress, tidak mau makan atau bahkan mati. Kualitas pakan dan minuman yang diberikan juga harus memadai sesuai dengan asupan perhari untuk model hewan coba.

2.8.2 Penetapan Dosis MLC901

Dosis harian MLC901 pada manusia dewasa yang disarankan adalah tiga kali dua kapsul. Dosis ekuivalen MLC901 pada tikus Wistar dengan berat badan 200 gram per harinya sebesar 49,6 mg Isi kapsul MLC901 (400 mg) kemudian dilarutkan dalam normal salin hingga mencapai konsentrasi 33,33 mg/ml. Sesuai penelitian Heurteaux et al. (2010) larutan tersebut direkomendasikan diinkubasi dengan kondisi agitasi selama 1 jam pada suhu 37°C, dilanjutkan disaring dengan filter berukuran 0,22 mm. Penelitian ini menggunakan volume pemberian per sonde perharinya sebanyak 1,5 ml, dibagi tiga kali pemberian menjadi 0,5 ml setiap kali sonde menurut acuan Nair dan Jacob (2016).

2.8.3 Pemberian Perlakuan

Perlakuan diawali dengan menginjeksi tikus dengan ketamin untuk keperluan anestesi secara intramuskular oleh peneliti bersama laboran. Tikus kemudian diberi tanda garis melintang pada anggota gerak atas dan bawah dengan posisi pronasi. Pada batas bagian

atas dan median, dilakukan insisi sepanjang 2.5 cm sampai mencapai visualisasi pada bagian torakal (T)9-11 tikus seperti pada kelompok 1. Laminektomi kemudian dilakukan sebagai bagian dari proses induksi cedera spinal. Pada area T9-11 dilakukan diseksi secara tajam dan tumpul sampai membuka celah antar vertebra. Dari celah ini kemudian dilakukan laminektomi dengan memotong lamina pada daerah kanan dan kiri. Setelah selesai, dilakukan laminektomi torakal 10 pada seluruh kelompok hewan coba yang diteliti.

Langkah selanjutnya, sesuai rekomendasi dari Verma et al. (2019) induksi CMS tipe kontusio dilakukan pada kelompok 2 dan 3. Posisi tikus difiksasi agar paparan medula spinalis dapat terpapar dengan jelas tanpa membuka durameter. Kemudian pada bagian medula spinalis yang terpapar, dijatuhkan beban seberat 10 gram secara bebas dari ketinggian 50 mm. Luka insisi kemudian ditutup dengan teknik fasia superfisial, skin stapler pada kulit hewan coba dan diaplikasikan antibiotik serta Gentamycin 1,3% pada luka insisi sebelum luka ditutup.

Pada kelompok 3 dilakukan intervensi dengan memberikan MLC901 melalui oral sebanyak 0,5 ml dengan konsentrasi larutan 33,33 mg/ml. Intervensi MLC901 ini diberikan dua jam pasca induksi, sebanyak tiga kali sonde per hari sampai dengan hari ketujuh.

Pemberian makanan dan minuman pada hewan coba tikus selama

masa perlakuan dari hari pertama sampai dengan hari ketujuh disesuaikan posisinya agar para hewan coba tikus dapat dengan mudah menjangkaunya. Perawatan luka operasi dilakukan setiap tiga hari sekali. Bagi hewan coba tikus dengan gangguan pengosongan kandung kemih pasca induksi, dibantu secara manual setiap enam sampai delapan jam, khususnya pada tiga hari pertama.

2.8.4 Penilaian Fungsi Motorik Tikus

Sesuai dengan rekomendasi dari Basso et al. (1996) yaitu skala BBB menjadi acuan penilaian fungsi motorik yang dilakukan pada hari ketujuh. Sebelum operasi dilakukan, terlebih dahulu hewan coba tikus dilatih dengan ditempatkan dilapangan terbuka menggunakan plastik melingkan yang halus dan tidak licin, berdiameter 90 cm dengan tinggi 7 cm. Setelah pelatihan dilakukan terhadap hewan coba tikus, terlihat tikus menjadi tidak agresif dan pengujian dilakukan selama empat menit menggunakan skala peringkat lokomotif BBB.

2.8.5 Pengambilan Darah, Jaringan dan Euthanasia Sampel

Sejak pengambilan sampel selesai, pemeriksaan dan sampling material diproses di laboratorium Patologi dengan perlakuan yang sesuai agar tidak terjadi regangan dan tarikan specimen. Pengukuran dilakukan melalui panjang dan diameter sampel. Untuk pengerjaan blok parafin, medula spinalis dipotong dari ujung ke ujung

dengan panjang kurang lebih 2-4 mm. Jaringan medula spinalis kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3-5 kali agar terbebas dari kontaminasi dan fiksasi formalin 10%. Selanjutnya dengan etanol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80% dan 96%) dilakukan dehidrasi selama masing-masing 60 menit. Tahapan clearing lalu dilakukan dengan xylol sebanyak dua kali masing-masing 60 menit. Infiltasi dengan paradin lunak selama 60 menit dengan suhu 48 derajat celcius. Pada parafin keras kemudian dibuatkan blok dan didiamkan selama 24 jam. Keesokan harinya kemudian dipotong setebal 4-6 μ m dengan rotary microtome. Mounting pada gelas objek dengan gelatin 5%.

Pada object glass diletakkan jaringan yang telah disayat dengan microtome dan dilakukan deparafinisasi dengan menarik atau menghilangkan parafin yang berada dalam jaringan. Caranya dengan menginput parafin sayatan jaringan tersebut ke dalam xylol sebanyak tiga kali, masing-masing selama dua menit dan kemudian secara berturut dimasukkan ke dalam etanol dengan konsentrasi secara bertahap menurun, mulai dari 100% sebanyak tiga kali masing-masing selama satu menit. Selanjutnya 90%, 80%, dan 70% masing-masing satu menit.

Kemudian pencucian dengan air keran dilakukan sekitar lima menit dan dimasukkan ke dalam Harris Haematoxylin (enam menit), kemudian dibilas dengan air dan dimasukkan ke dalam alkohol asam

1% (3-5 celup) dibilas lagi dengan air, lalu celupkan pada air ammoniak (sampai berwarna biru) dan masukkan ke larutan eosin berturut-turut dimasukkan ke dalam etanol 95% (dua kali) (masing-masing selama satu menit), xylol (tiga kali) (masing-masing selama dua menit).

Mounting kemudian dilakukan dengan entelan dan dianalisis menggunakan mikroskop. Bagi hewan coba tikus yang sampelnya sudah terambil pada hari ketujuh kemudian dilakukan eunthanasia dengan metode dislokasi leher.

Hewan coba pada penelitian ini dilakukan berdasarkan aturan etik penelitian sesuai deklarasi Helshinski. Pada umumnya perawatan hewan postmortem dilakukan pada akhir penelitian dengan memasukkannya ke dalam kantong plastik, dibakar di incinerator dan kemudian dikubur dengan baik.

2.8.6 Pembuatan Sediaan Hispatologis

- a. Tahap Fiksasi. Jaringan direndam dalam larutan formalin buffer fosfat 10% selama sehari
- b. Tahap Dehidrasi. Jaringan direndam dengan alcohol bertingkat berturut-turut 30%, 40%, 50%, 70%, 80%, 96%, masing-masing tiga kali dengan durasi selama 25 menit.
- c. Tahap Clearing. Jaringan dimasukkan ke dalam clearing agent xylene selama satu jam masing-masing sebanyak tiga kali hingga

transparan.

- d. Tahap Embedding. Setelah dilakukan infiltrasi sebanyak tiga kali masing-masing selama satu jam dengan parafin murni, kemudian jaringan ditanam kedalam parafin cair, dibiarkan membentuk blok (kurang lebih tiga jam) agar mudah diiris dengan mikrotom.
- e. Tahap Pemotongan. Proses pemotongan jaringan menggunakan mikrotom, tebal lima μm , selanjutnya dilakukan penempelan pada gelas objek yang telah dilapisi daya rekat seperti Poly-Lysine, lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama dua jam.

2.8.7 Pemeriksaan Ekspresi AQP-4

Cara pengambilan darah pada tikus melalui pleksus retroorbital pada mata. Tikus dipegang dan dijepit bagian tengkuk dengan jari tangan, kemudian tikus dikondisikan senyaman mungkin. Mikrohematokrit digoreskan pada medial kantung mata di bawah bola mata ke arah foramen optikus. Kemudian mikrohematokrit diputar hingga melukai pleksus. Apabila diputar lima kali maka harus dikembalikan arah putarannya sebanyak lima kali. Darah ditampung pada tabung yang telah diberi EDTA untuk tujuan pengambilan plasma darah. Sampel darah vena sebanyak 1 cc akan diukur ekspresi AQP-4 nya dengan ELISA kit Universal Biologicals di laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Darah dikumpulkan antara pukul 8:00 dan 9:30 pagi di tabung antikoagulan dan dijaga

selama satu jam, diikuti dengan satu jam pada suhu 40°C. Setelah di sentrifugasi pada 2000 g selama 15 menit pada suhu 40°C, sample serum disimpan sampai satu bulan pada suhu 200C dan kemudian dianalisis secara rangkap tiga pada waktu bersamaan. Cairan diukur menggunakan kit ELISA (Rat Aquaporin 4 ELISA Kit (AQP4) 96T, UNIVERSAL BIOLOGICALS) pada pembaca lempeng-lempeng (Instrumen Anthos Labtec) yang ditetapkan pada 450 nm.

2.8.8 Pemeriksaan Kadar MDA

Pengecatan MDA mempergunakan Genetex Malondialdehyde antibodi 50 uL GTX12835_50 uL, dengan menggunakan metode polymer pengecatan immuhistokimia.

- a. Sebelum dilakukan pengecatan, slide melalui proses deparafinisasi dan rehidrasi meliputi perendaman dalam larutan xylene dua kali selama lima menit, etanol 100% selama dua menit, etanol 96% dua kali selama dua menit, etanol 70% selama dua menit dan PBS selama dua menit.
- b. Selanjutnya masuk ke prosedur kerja IHK, pertama dengan memotong blok parafin dengan mikrotom pada ketebalan 3-4 μ dan dicelupkan ke dalam waterbath.
- c. Lalu ambil potongan jaringan dengan slide dan tiriskan.
- d. Tuliskan pada slide kode masing-masing sesuai blok parafin dengan menggunakan pensil.

- e. Setelah masing-masing kode tertera pada slide, maka dilakukan proses pemanasan slide diatas Hot Plate selama 1 jam lalu dinginkan slide dan masukkan ke dalam keranjang slide.
- f. Selanjutnya dilakukan proses deparafinasi (Xylol I, Xylol II, Xylol III) masing-masing 5 menit.
- g. Kemudian rehidrasi dengan menggunakan Alkohol 96%, Alkohol 80%, Alkohol 70%), masing-masing selama 5 menit lalu cuci dengan air mengalir kurang lebih selama 5 menit.
- h. Angkat dari air, lalu masukkan slide ke dalam larutan Blocking Endogen Peroksida dan rendam selama 15 menit dan cuci kembali dengan air mengalir selama 5 menit.
- i. Masukkan keranjang berisi slide ke dalam decloaking yang berisi larutan Antigen Retrieval Decloaking Chamber, lalu letakkan slide pada rack holder.
- j. Kemudian masukkan rack holder ke dalam deckloaking lalu tutup dan atur waktu selama 40 menit 95 derajat.
- k. Setelah itu, dinginkan dengan mengeluarkan slide dari deckloaking lalu disimpan pada suhu ruangan.
- l. Setelah dingin, cuci dalam larutan PBS 2x masing-masing selama 5 menit dan tandai slide dengan memberikan

lingkaran di sekitar jaringan.

- m. Atur slide pada baki slide lalu ambil satu per satu dan ditetaskan Background Sniper.
- n. Setelah ditetesi, kemudian diinkubasi selama 30 menit.
- o. Buang larutan background sniper dengan cara ditiriskan pada tisu.
- p. Teteskan antibodi primer lalu inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang dan cuci PBS dua kali selama 5 menit.
- q. Kemudian ditetaskan Trekkie Universal dan didiamkan selama 30 menit.
- r. Tiriskan pada tisu lalu ditetaskan Trekkavidin-HRP dan didiamkan selama 30 menit.
- s. Cuci PBS dua kali dengan cara merendam slide selama 5 menit.
- t. Sambil menunggu pencucian, larutan DAB dibuat dengan cara campurkan cromogen DAB 1 tetes + Substrat buffer 1 ml (dicampur dalam tabung bersih) lalu tetesi kejaringan.
- u. Kemudian jaringan diamati, dan jika sudah menunjukkan warna coklat dapat langsung direndam ke dalam air selama 5 menit.

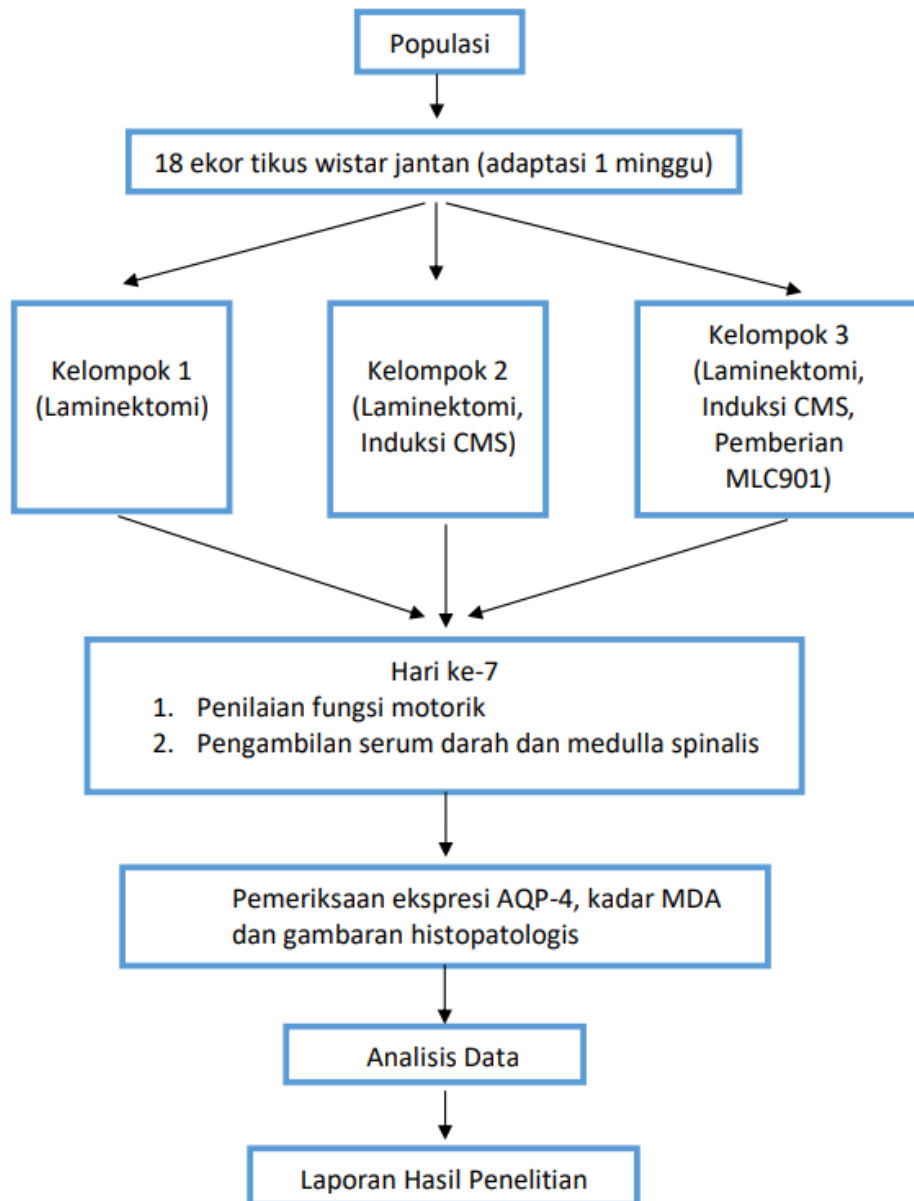
- v. Selanjutnya rendam dengan hematoxylinn meyer selama 5 menit dan cuci kembali dengan air mengalir selama 5 menit.
- w. Dehidrasi kemudian dilakukan kembali dengan menggunakan alkohol 70%, 80% dan 96%, selama masing-masing 5 menit.
- x. Clearing (Xylol I, Xylol II, Xylol III), lalu keringkan slide dan ditetesi dengan entelan kemudian ditutup dengan deck glass.
- y. Setelah seluruh prosesnya, selesai kemudian diamati melalui mikroskop.

2.8.9 Pemeriksaan Gambaran Histopatologis

Pemeriksaan sampel medula spinalis setelah induksi CMS kronis derajat berat dilakukan dengan menganalisis area lokasi induksi/lesi. Untuk evaluasi secara umum, dilakukan pembesaran awal sebesar 100 kali dengan menggunakan mikroskop. Selanjutnya, pembesaran 400 kali dilakukan untuk pemeriksaan sel. Interpretasi dari gambaran histopatologis ini menjadi acuan penilaian dari perdarahan, kavitasi, degenerasi mielin dan perbandingan ukuran diameter siringomyelia pada medula spinalis. Kemudian untuk memperoleh nilai kuantitatifnya, luas area lesi dan kavitasi diukur dengan menggunakan aplikasi Qupath.

2.9 Alur Penelitian

Berdasarkan metodologi penelitian yang telah dijelaskan sebelumnya, maka dapat dibuatkan alur penelitian sebagai berikut:



Gambar 2.3

Bagian Alur Penelitian

2.10 Analisis Data

Berdasarkan data yang telah terkumpul kemudian dilakukan cleaning, coding, tabulasi dan data entry ke dalam komputer. Data yang diperoleh mencakup ekspresi AQP-4, kadar MDA, gambaran histopatologis, fungsi motorik. Penelitian ini menganalisis data yang tersedia menggunakan program Statistical Program for Social Science (SPSS) versi 23.0 untuk Macintosh. Nilai p pada batas kemaknaan 0,05 dengan interval kepercayaan 95%.

2.10.1 Analisis Deskriptif

Analisis data deskriptif rata-rata ekspresi AQP-4 dan kadar MDA skor BBB dalam penelitian ini digunakan untuk melihat gambaran karakteristik dasar subyek pada kelompok-kelompok penelitian. Hasil ditampilkan dalam bentuk nilai rata-rata dengan standar deviasi sebagai ukuran pemusatan.

2.10.2 Analisis Inferensial

Data ekspresi AQP-4, kadar MDA dan skor BBB dinyatakan dalam skala numerik. Analisis normalitas data dilakukan untuk mengetahui distribusi data. Uji normalitas menggunakan Shapiro-wilk test dengan nilai $p = 0.05$. Hasil uji normalitas data ekspresi AQP-4, kadar MDA dan skor BBB dinyatakan bahwa data berdistribusi normal apabila $p > 0.05$. Analisis homogenitas data dilakukan untuk mengetahui homogenitas data. Uji homogenitas data

menggunakan Leven`s test, menyatakan bahwa data memiliki varian tidak homogen bila ($p < 0.05$), sedangkan data memiliki varian yang homogen bila ($p > 0.05$).

Analisis komparasi menggunakan uji One Way ANOVA (Analysis of Variance) multiple comparison classical test untuk mengetahui beda rata-rata ekspresi AQP-4, kadar MDA dan skor BBB antar kelompok yang varian data homogen. Perbedaan rata-rata ekspresi AQP-4, kadar MDA dan skor BBB dianalisis menggunakan ANOVA Welch test apabila terdapat kelompok data dengan varian tidak homogen. Uji post hoc dengan tes LSD digunakan untuk menguji perbedaan antar kelompok perlakuan dengan varian homogen. Sedangkan uji post hoc dengan games-howell dilakukan untuk menguji perbedaan antar kelompok perlakuan dengan varian tidak homogen.

2.10.3 Analisis Multivariat

Analisis jalur dilakukan berdasarkan teori yang telah dijelaskan sebelumnya. Analisis jalur untuk mengetahui peran pemberian MLC901 terhadap fungsi motorik melalui variabel perantara yaitu ekspresi AQP-4 dan kadar MDA dan gambaran histopatologis berdasarkan jalur kontribusinya.

2.11 Kebaharuan Penelitian (Novelty)

Pada penelitian sebelumnya, proses gliosis, apoptosis dan inflamasi pada CMS sudah terbukti. Khususnya CMS pada fase kronik, gambaran histopatologis dan fungsi motorik dapat memburuk.

Pada penelitian cedera SSP seperti pada penderita stroke dan neurotrauma, pemberian MLC901 yang mengandung bahan aktif alami belum dapat dipenuhi sepenuhnya.

Kebaharuan (novelty) dari penelitian ini dianggap menarik dan mampu memperkuat teori terkait terapi dan penyembuhan CMS. Pemberian MLC901 juga berpotensi memperbaiki proses gliosis, apoptosis, respon inflamasi, gambaran histopatologis medula spinalis serta luaran fungsi motorik pada tikus wistar pasca induksi CMS derajat berat.