

**GAMBARAN HISTOPATOLOGIS
CEDERA MEDULA SPINALIS
PASCA PEMBERIAN SEKRETOM PT DERMAMA**

Tim Peneliti:

Drh Mokhamad Fahrudin, PhD
Dr Drh Trioso Purnawarman, MSi
Prof Drh Ekowati Handharyani, PhD, APVet
Drh Kusdiantoro Mohamad, MSi
Drh. Arni Diana Fitri
Dr Drh Andi Aulia Mustika, MSi
Dr Drh Andriyanto, MSi
Drh Wahono Esthi Prasetyaningtyas, M.Si
Dr Bambang Darwono
Dr Indah Yulianto
Anantio Bayuardi, MSc



**SEKOLAH KEDOKTERAN HEWAN DAN BIOMEDIS
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
2022**

PRAKATA

Penelitian dengan judul “Gambaran Histopatologis Cedera Medula Spinalis Pasca Pemberian Sekretom PT Dermama” ini merupakan penelitian kerjasama yang dilaksanakan di Rumah Sakit Hewan Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor (RSHP FKH IPB) pada bulan Agustus – Desember 2018.

Penelitian didanai oleh PT. Dermama Bioteknologi Laboratorium sebagai implementasi kerjasama antara Fakultas Kedokteran Hewan IPB dengan PT. Dermama Bioteknologi Laboratorium.

Penelitian dilakukan oleh tim, yang terdiri dari: Drh Mokhamad Fahrudin, PhD; Dr Drh Trioso Purnawarman, MSi; Prof Drh Ekowati Handharyani, PhD, APVet; Drh Kusdiantoro Muhammad, MSi; Drh. Arni Diana Fitri; Dr Drh Andi Aulia Mustika, MSi; Dr Drh Andriyanto, MSi; Dr Bambang Darwono; Dr Indah Yulianto; Anantio Bayuardi, MSc. Para peneliti juga telah memberikan masukan dalam penulisan laporan ini.

Selanjutnya, hasil penelitian ini disimpan di repositori IPB untuk akses public sesuai peruntukannya dengan tetap menjaga hak cipta dan hak-hak lain yang melekat pada para penulis dan institusi pemberi dana. Semoga laporan penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Bogor, Juni 2022

Penulis

DAFTAR ISI

PRAKATA	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR GAMBAR	ii
I. PENDAHULUAN	1
I. 1 Latar Belakang	1
I. 2 Tujuan	1
II. METODE PENELITIAN	2
2. 1 Tempat dan Waktu Penelitian	2
2. 2 Alat dan Bahan	2
2. 3 Hewan Percobaan	2
2. 4 Perkandangan, Pakan, dan Air Minum	3
2. 5 Aklimatisasi	3
2. 6 Metode Perusakan Sel Saraf Spinal	3
• Preparasi Ruang dan Meja Operasi	3
• Preparasi Peralatan Operasi	3
• Preparasi Pakaian Operasi	4
• Preparasi Operator	4
• Persiapan Hewan	4
2. 6. 1 Metode <i>Dissectomy</i>	4
2. 6. 2 Metode Kompresi	5
2. 6. 3 Penusukan (<i>Drilling</i>).....	5
2.7 Pascaoperasi dan Perawatannya	6
2.8 Sampling dan Pengambilan Data	7
2.9 Parameter yang Diamati	7
3.0 Analisis Data	7
III. HASIL DAN PEMBAHASAN	8
KESIMPULAN	21
DAFTAR PUSTAKA.....	22

DAFTAR GAMBAR

1. Rencana produksi SCI, Perlakuan, dan Pengambilan sampel	6
2. Grafik respons gerakan rata-rata pada tikus percobaan yang mengalami kelumpuhan total	10

3.	Grafik respons gerakan rata-rata pada tikus percobaan yang mengalami kelumpuhan parsial	11
4.	Gambar makroskopik spinal cord yang mengalami trauma	13
5.	K9; spinal cord pascatrauma, terlihat respons degenerasi neuron dan nekrosis, infiltrasi sel-sel radang, dan pembentukan sistik	15
6.	K9, spinal cord pascatrauma; ditandai dengan degenerasi neuron oligodendrogliosis dan pembentukan sistik	15
7.	A91; spinal cord pasca trauma, satu minggu pasca aplikasi sekretom stem cell, dengan perbesaran kecil masih ditemukan lesio	16
8.	Spinal cord, satu minggu pasca aplikasi sekretom stem cell, demyelinasi axon, gliosis, dan degenerasi neuron masih sangat jelas	16
9.	A16; spinal cord pasca trauma, dua minggu setelah aplikasi sekretom stem cell, area trauma masih jelas dengan perbesaran kecil. Degenerasi neuron dan pembentukan sistik berkurang	17
10.	Spinal cord, kondisi astrosit pada substansia alba. Sel-sel astrosit menunjukkan respons positif terhadap keberadaan GFAP pada spinal cord yang mengalami trauma, trauma dan satu minggu pasca aplikasi sekretom stem cell, dua minggu aplikasi sekretom stem cell	18
11.	Spinal cord di daerah sentral pasca trauma, pewarnaan imunohisto-kimia terhadap glial fibrillary acidic protein (GFAP) atau mengetahui perkembangan sel-sel astrosit pasca aplikasi sekretom stem cell. (A) satu minggu pasca aplikasi sekretom stem cell, dua minggu pasca aplikasi sekretom stem cell ...	19
12.	Spinal cord di perifer, menunjukkan medula spinalis yang divisualisasi dengan S 100 protein. Trauma akan menyebabkan hilangnya kelopak myelin/demyelinasi axon, kondisi sel medula setelah satu minggu aplikasi sekretom stem cell dan dua minggu setelah aplikasi sekretom stem cell	20
13.	Kondisi sumsum tulang/bone marrow pada vertebrae di sekitar trauma spinal cord. Sel-sel hematopoietic menunjukkan aktivitas proliferasi atau keberadaan proliferasi cell nucleic acid/PCNA; pada kondisi trauma, satu minggu setelah aplikasi sekretom stem cell dan dua minggu setelah aplikasi sekretom stem cell	21

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sel punca atau *stem cell* merupakan sel-sel pluripoten yang memiliki potensi untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi satu atau lebih jenis sel khusus sebagai respons terhadap stimuli sinyal yang sesuai (Lee dan Makkar, 2004). Dewasa ini pemanfaatan *stem cell* atau *niscnya* dalam dunia pengobatan dengan menggunakan sel merupakan metode pengobatan yang berkembang pesat. Dalam aplikasi pemanfaatan *stem cell* untuk tujuan terapi, sel-sel yang akan digunakan harus dapat berdiferensiasi menjadi sel khusus yang sesuai dengan jaringan/organ target yang cedera yang nantinya diharapkan. Mekanisme ini membuka kesempatan terhadap pengembangan metode induksi diferensiasi sel punca menjadis sel-sel khusus yang dikehendaki untuk kemudian digunakan dalam terapi menggantikan sel sel tubuh yang rusak.

Terapi khusus pada kasus trauma saraf pusat pada manusia belum banyak dilakukan, sehingga masih kecil harapan untuk pulih secara total pada kasus trauma saraf. Saputra (2006) melaporkan pengobatan pada pasien penderita *stroke* dengan menggunakan *stem cell* memperlihatkan adanya pengurangan volume lesi sebanyak 40% dan 70% kemampuan kembali ke fungsi normal. Perbaikan fungsi tubuh sebagai hasil dari terapi *stem cell* salah satunya disebabkan oleh banyaknya faktor-faktor transkripsi dan pertumbuhan, yang dapat menstimulasi kembalinya fungsi sel yang rusak.

Selain di dalam *stem cell*, faktor pertumbuhan yang dikandung pada sel, diduga juga terdapat di dalam media kultur *stem cell* yang dikenal secara umum sebagai *sekretom*. PT Dermama mengembangkan *sekretom stem cell* dalam upaya untuk mengembangkan metode terapi melalui stimulasi perbaikan jaringan tubuh yang mengalami cedera. Berdasarkan tujuan ini PT Dermama melakukan penelitian pendahuluan untuk mengetahui efektivitas *sekretom stem cell* dalam memperbaiki cedera sistem syaraf pusat dengan menggunakan hewan model tikus putih. Dengan demikian, produk ini diharapkan dapat memberikan peluang dan harapan untuk mengobati berbagai penyakit-penyakit syaraf pada masa yang akan datang.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian pendahuluan ini ialah melihat respon jaringan syaraf yang cedera terhadap *sekretom stem cell* yang diproduksi PT Dermama dalam memperbaiki

cedera pada bagian sistem syaraf pusat yakni medula spinalis dengan menggunakan tikus putih sebagai hewan model.

II. METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober sampai dengan Desember 2018, bertempat di kandang tikus Rumah Sakit Hewan Pendidikan (RSHP) Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor (FKH-IPB).

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada operasi adalah bor MINI GRINDER SET DC-S024® dengan spesifikasi input 100-240V AC~50/60HZ, output 18V DC 2A, No load speed 5000-18000 RPM, *rated intup power* 20W, *Keyless Chuck* 0.5/1.0/1.5/2.4/3.2MM, *Grinder weight* dan mata bor untuk *knabel tang kecil*; *iris scissors*; dan seperangkat alat bedah minor yang terdiri atas *towel clamp*, *handle scalpel*, *dressing thumb forcep*, *rat tooth tissue forcep*, *mayo scissor staright sharp-sharp*, *mayo scissor staright sharpblunt*, *mayo scissor curved sharp-blunt*, *straight kelly hemostat*, *curved kelly hemostat*, *straight rat tooth kelly hemostat*, *curved rat tooth kelly hemostat*, serta *needle holder*. Selain itu, operasi ini juga menggunakan set ortopedi *rodential dental set*, *silk 3/0* dan *4/0*, tampon, alat pencukur rambut (*hair clipper*) Codos micro hairclip®, kassa steril, kain penutup/duk, meja operasi keramik, lampu operasi, timbangan rodensia kecil, dan *syringe* 1 dan 3 mL.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu alkohol 70%, NaCl fisiologis, ketamin 10%, xylazine 20%, ketoprofen, iodine, dan amoxicillin. Tikus yang digunakan untuk operasi sebanyak tiga kelompok tikus. Kelompok pertama dilakukan dengan *dissectomy medula spinalis* setelah dilakukan *laminectomy*. Kelompok kedua menggunakan metode kompresi medula spinalis, dan kelompok ketiga dilakukan dengan pendekatan penusukan (*drilling*) pada medula spinalis.

1.3 Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 33 ekor tikus putih jantan galur Sprague Dawley dengan bobot antara 200-300 g dan umur berkisar 2,5-3 bulan. Tikus percobaan yang digunakan berasal dari BPOM RI. Tikus merupakan mamalia yang sering dijadikan sebagai hewan model untuk berbagai macam pengujian, termasuk pengujian trauma pada medula spinalis.

1.4 Perkandangan, Pakan, dan Air Minum

Kandang yang digunakan dalam penelitian ini ialah kandang individu yang terbuat dari plastik dengan ukuran 30 x 40 x 15 cm yang ditutup dengan anyaman kawat. Kandang tersebut dialas dengan serutan kayu yang telah dioven. Kandang tikus percobaan juga dilengkapi dengan tempat minum individu. Selanjutnya, kandang individu ditempatkan pada ruangan dengan suhu 25-30°C dan kelembaban relatif 80-90%. Ransum pakan yang akan diberikan pada tikus adalah ransum telah memenuhi standar BPOM RI. Sementara itu, air minum tikus percobaan menggunakan air mineral. Baik pakan dan minum diberikan secara *ad libitum*.

1.5 Aklimatisasi

Sebelum digunakan untuk penelitian, tikus percobaan diaklimatisasikan selama 14 hari. Aklimatisasi dilakukan untuk memberikan kesempatan pada tikus percobaan untuk menyesuaikan diri terhadap lingkungan kandang. Setelah aklimatisasi, tikus percobaan diberi perlakuan untuk merusak sel saraf spinal.

2.6. Metode perusakan sel saraf spinal

Perlakuan untuk merusak sel saraf dilakukan melalui pemotongan jaringan syaraf (*dissection*), trauma tekanan (*pressure*), dan penusukan (*drilling/punctio*). Ketiga metode ini dilakukan melalui tahapan operasi. Adapun persiapan operasi yang dilakukan diuraikan sebagai berikut.

- **Preparasi Peralatan Operasi**

Peralatan operasi (alat bedah minor dan mata bor) direndam didalam air sabun, disikat dan dibilas hingga bersih. Kemudian alat tersebut dikeringkan dengan menggunakan *tissue*/lap bersih. Peralatan yang telah dibersihkan dimasukkan kedalam bak *instrument* dengan susunan sebagai berikut (bawah-atas): *needle holder*, *curved rat tooth kelly hemostat*, *straight rat tooth kelly hemostat*, *curved kelly hemostat*, *straight kelly hemostat*, *mayo scissor curved sharp-blunt*, *mayo scissor staright sharp-blunt*, *mayo scissor staright sharp-sharp*, *rat tooth tissue force*, *dressing thumb forcep*, *handle scalpel*, *towel clamp*, dan mata bor. Kemudian bak peralatan bedah minor diletakkan di tengah dua lapis kain. Bak peralatan dibungkus dengan lapis kain pertama dengan cara sisi kain dilipat dengan urutan sisi yang paling dekat dengan tubuh, sisi sebaliknya, sisi kanan kemudian sisi kiri. Pembungkusan dilanjutkan

dengan lapis kain kedua (posisi kain berbentuk belah ketupat), urutan lipatan yaitu sisi yang paling dekat dengan tubuh, sisi kanan, sisi kiri, dan sisi yang paling jauh. Bagian yang dilipat disisakan (seperti lidah) untuk memudahkan asisten operator membuka bungkusan alat. Bak *instrument* dimasukkan kedalam *oven* dengan suhu 100°C selama 60 menit.

Sterilisasi dalam oven dengan suhu 100°C (60 menit) juga dilakukan pada set ortopedi dan duk untuk memegang bor. Bor yang digunakan untuk operasi disucihamakan menggunakan alkohol 70% dan dibalut dengan duk.

- **Preparasi Operator**

Langkah-langkah yang harus dilakukan operator dan asisten operator sebelum melakukan operasi adalah mencuci tangan menggunakan sabun dan air mengalir lalu menggunakan tutup kepala dan masker, kemudian mencuci tangan hingga siku menggunakan sabun dan sikat dengan penyikatan satu arah dari jari hingga ke siku pada air yang mengalir lalu dibilas dari ujung jari sebanyak 10-15 kali. Lalu tangan dikeringkan dengan menggunakan handuk masing-masing satu sisi untuk setiap tangan, lalu pakaian operasi operator digunakan dengan bantuan asisten. Langkah terakhir, sarung tangan dipakai dengan cara memerhatikan lipatan pada sarung tangan untuk menjaga kesterilan bagian yang akan kontak dengan pasien.

- **Persiapan Hewan**

Tikus yang disiapkan untuk operasi yakni sebanyak tiga ekor dan dipastikan dalam keadaan sehat. Setiap ekor tikus diinjeksi dengan obat bius kombinasi xylazine (5-12 mg/kg BB) dan ketamin (40-75 mg/kg BB) melalui rute intraperitoneal (Plumb 2008). Rambut tikus yang telah teranasthesi dicukur menggunakan *hair clipper*. Rambut tikus tersebut dicukur mulai dari leher sampai diantara kaki belakang. Lebar daerah cukuran sekitar 2 cm dari *processus spinosius ossa vertebrae*. Langkah selanjutnya ialah memberikan antiseptik berupa iodine pada permukaan kulit yang akan diinsisi dan di sekitar daerah insisi. Terakhir, tikus diposisikan *ventral recumbency* di atas meja operasi. Selanjutnya, metode perusakan saraf dengan metode *dissectomy*, kompresi, dan *drilling* disajikan sebagai berikut.

2.6.1. Metode *Dissectomy*

Sebanyak 3 ekor tikus percobaan dirusak saraf spinalnya dengan menggunakan metode *dissectomy*. Operasi dengan menggunakan teknik *dissectomy* dilakukan setelah dilakukan laminektomi pada os *vertebrae thoracalis* (Lukovic *et al.* 2015) dengan bantuan set ortopedi. Pematangan medulla spinalis yang terlihat

dilakukan seperti teknik pada *Punch Method*. Medulla spinalis yang terlihat dipotong menggunakan *iris scissor*. Hilangnya refleks dan pergerakan pada ekor dilihat setelah pemotongan medulla spinalis.

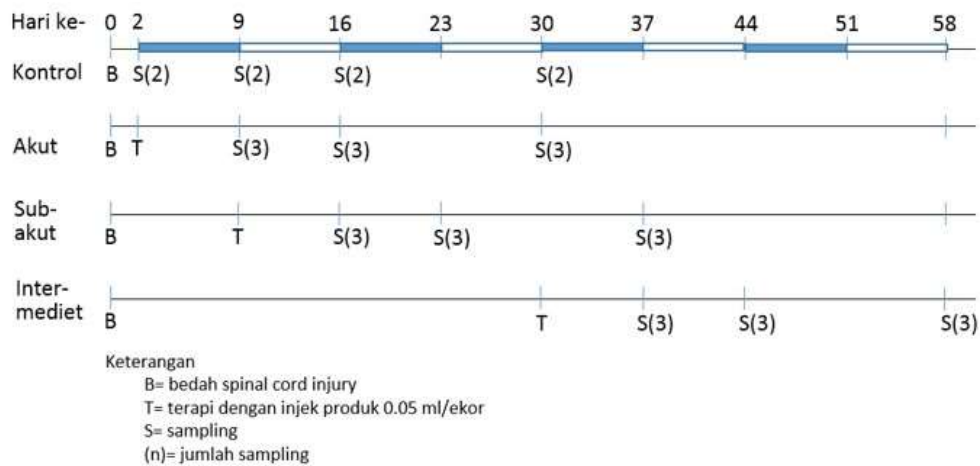
2.6.2. Metode Kompresi

Sebanyak 3 ekor tikus percobaan dirusak saraf spinalnya dengan menggunakan metode kompresi. Teknik ini diawali dengan pemotongan *processus spinosus* dan dilanjutkan dengan penekanan (kompresi) pada medulla spinalis sampai dengan hilang refleks pada kaki belakang.

2.6.3. Penusukan (*drilling*)

Tahapan pertama dari metode *drilling* ialah preparasi operasi dan anestesi tikus percobaan sebagaimana telah diuraikan sebelumnya. Setelah teranestesi, tikus percobaan dibedah pada punggung di daerah thorax ke 9-11. Pembedahan dilakukan dengan melakukan insisi longitudinal sepanjang sekitar 2.5 cm pada kulit di atas ossa vertebrae T9-T11. Jaringan lemak subcutis dihilangkan dan akan terlihat otot-otot yang menyelubungi *columna vertebralis*. Otot-otot tersebut dikuakan menggunakan scalpel agar ossa vertebrae T9-T11 terlihat. *Vertebrae thoracalis* dilubangi menggunakan mikrobor dengan diameter sekitar 2,5 mm. Kulit dan otot dikuakan secara perlahan menggunakan *iris scissor*. Kemudian, jarum 23G ditusukkan ke medulla spinalis hingga rusak melalui lubang pada medula spinalis yang sudah dibuat. Hilangnya refleks dan pergerakan pada kaki belakang dilihat setelah merusakkan medulla spinalis. Kerusakan medula spinalis ditandai dengan berhentinya gerakan pada kedua kaki belakang dan ekor tikus percobaan.

Sebanyak 27 ekor tikus dirusak medula spinalisnya dengan metode *drilling*. Selanjutnya, 2 hari pascapembedahan, tikus yang telah rusak sarafnya ini dibagi menjadi 2 perlakuan, yaitu tikus percobaan tidak diberikan pengobatan sebagai kontrol (diinjeksikan NaCl fisiologis steril) dan tikus percobaan yang diberikan pengobatan produk PT Dermama sebagai perlakuan. Pemberian pengobatan produk PT Dermama dilakukan dengan menginjeksikan secara intramuskular (IM) dosis 0.07 mL/ekor. Pengambilan data dan sampel dilakukan pada hari ke-2 (akut), 9 (subakut), dan 30 (intermediet) pasca aplikasi produk PT Dermama (Gambar 1).



Gambar 1. Rencana produksi SCI, Perlakuan, dan Pengambilan sampel

2.7. Pascaoperasi dan perawatannya

Setelah selesai operasi, luka pascapembedahan pada tikus percobaan diberikan antibiotik (*Amoxicillin*) secara topikal sebelum luka ditutup. Penutupan luka dilakukan baik pada otot dan kulit menggunakan benang *silk 2/0* dengan pola jahitan *cross mattress suture*. Permukaan kulit yang telah dijahit diberikan antiseptik (*Iodine*). Manajemen rasa sakit dilakukan dengan pemberian *Ketoprofen* (5 mg/kg BB) melalui injeksi intramuskular (Plumb 2008). *Ketoprofen* diberikan satu kali setiap hari selama tiga hari.

Tikus yang telah dioperasi ditempatkan dalam kandang individu dengan litter dari serutan kayu. Tikus dirawat dengan cara diberikan makan dan minum; diberikan analgesik dan antiinflamasi; difisioterapi; dan diamati perubahan yang terlihat. Perawatan lain yang dilakukan selama post operasi ialah pemberian pakan dan minum setiap pagi dan sore hari. Tikus diberi makan dengan meletakkan pakan berupa pellet di dekat mulut tikus. Sementara itu, tikus diberi minum dengan mendekatkan mulut botol minuman ke mulut tikus. Jika tikus telah selesai minum, botol ditempatkan dekat dengan makanannya. Mulut botol tersebut juga diposisikan lebih rendah agar mudah dijangkau oleh tikus tersebut.

Tikus-tikus yang lumpuh setiap pagi dibantu urinasi dengan menekan vesika urinaria secara perlahan. Tikus tersebut juga difisioterapi dengan cara melakukan flexio dan extensi pada kaki yang lumpuh. Fisioterapi juga dilakukan pada bagian ekor tikus dengan menggerakkan ekor tikus ke atas dan ke bawah. Pengamatan kondisi tikus pascaoperasi rutin dilakukan setiap pagi dan sore hari.

1.6 Sampling dan Pengambilan Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas data fungsi motorik tikus percobaan yang diamati secara klinis serta gambaran histopatologi (HP). Data fungsi motorik tikus percobaan diamati menggunakan dengan menghitung respons gerakan per satuan waktu. Sampling jaringan saraf medula spinalis dilakukan pada hari ke-2 (sebelum aplikasi sekretom), 9, 16, dan 30 pascaoperasi.

1.7. Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian ini ialah repons motorik yang tergambar melalui jumlah gerakan tikus percobaan per satuan waktu. Selain itu, untuk melihat proses persembuhan dilakukan pemeriksaan PA dan HP sel saraf pada medula spinalis.

1.8. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hasil

Sebanyak 3 ekor tikus dirusak saraf medula spinalis-nya dengan metode *dissectomy*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa 3 ekor tersebut mengalami kematian pada hari ke-1 (24 jam pascaoperasi). Hal ini menunjukkan bahwa tikus percobaan yang saraf medula spinalis-nya dirusak dengan menggunakan metode *laminectomy* memiliki risiko kematian yang tinggi yang dapat mencapai 100%.

Medula spinalis yang dirusak akan mengalami perubahan patologis berurutan termasuk perdarahan, edema, nekrosis akson dan neuron, dan demyelinasi diikuti oleh pembentukan kista dan infark (Bresnahan *et al.*, 1976; Blight, 1983). Dohrman *et al.*, (1971) menyatakan bahwa dalam 5 menit setelah cedera vena dari *grey matter* mengembang karena keberadaan eritrosit, tetapi akson tampak tidak berubah. Pada 15 dan 30 menit pasca trauma, perdarahan kecil terlihat dengan ekstravasasi eritrosit ke dalam ruang perivaskular venula post-kapiler dan otot, dan beberapa perubahan aksonal juga teramati. Saat percobaan, 3 ekor tikus mengalami kematian pada hari ke-1 (24 jam pascaoperasi). Hal ini mungkin berkenaan dengan adanya kejadian tromboembolism. Menurut Frisbie dan Sharma, (1992), tromboemboli adalah penyebab utama morbiditas dan mortalitas dari kejadian kerusakan medula spinalis. Tromboemboli telah dilaporkan terjadi pada 70-100% pasien yang mengalami kelumpuhan motorik lengkap setelah kerusakan medula spinalis.

Pada tikus percobaan yang medula spinalisnya dirusak dengan metode kompresi menunjukkan hasil dari 3 ekor, 2 ekor mengalami kematian berturut-turut pada hari ke-1 dan 3 pascaoperasi. Satu ekor tikus percobaan masih hidup. Hal ini menunjukkan bahwa metode kompresi untuk merusak medula spinalis tikus percobaan juga memiliki risiko yang tinggi dan hasil yang belum konsisten sesuai dengan harapan.

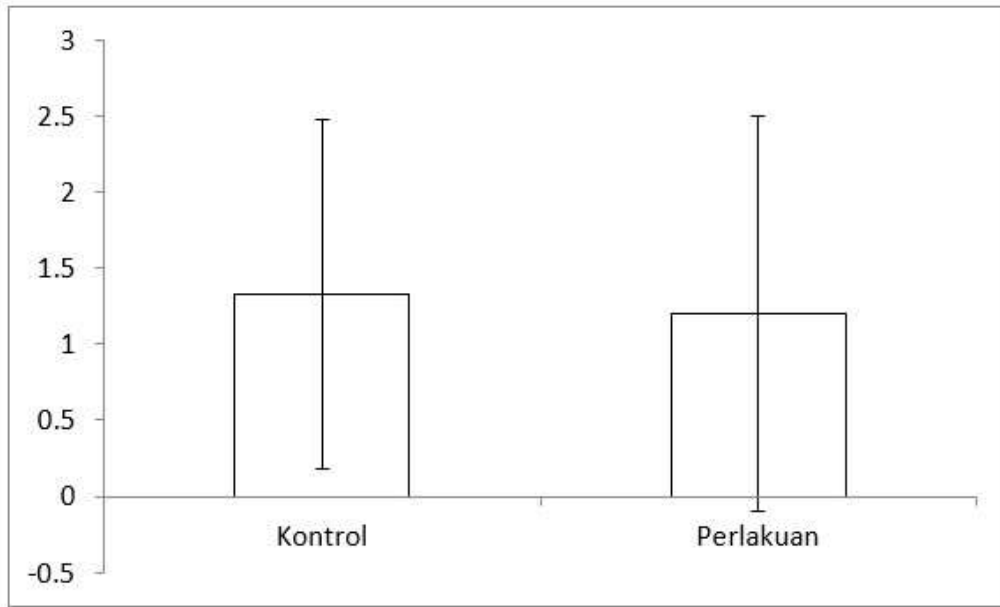
Menurut Rivlin and Tator (1977), gangguan motorik memuncak dalam 24 jam pada hewan yang mengalami kerusakan medula spinalis dengan metode *compressive* selama 20 menit. Menurut Dimarco dan Dawson (2014), secara umum risiko kematian meningkat dengan meningkatnya derajat gangguan neurologis. Gangguan neurologis dapat terjadi akibat trauma yang dihasilkan dari metode kompresi yang dilakukan. Menurut Dohrman *et al.*, (1971), 4 jam setelah kerusakan medula spinalis, sebagian selubung myelin akan terganggu, terdapat degenerasi akson, dan cedera endotel akibat iskemik. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa terdapat

edema yang berkembang di lokasi cedera dan menyebar ke segmen yang berdekatan dari medula spinalis dan menyebabkan cedera nekrotik (Tator dan Rowed, 1979).

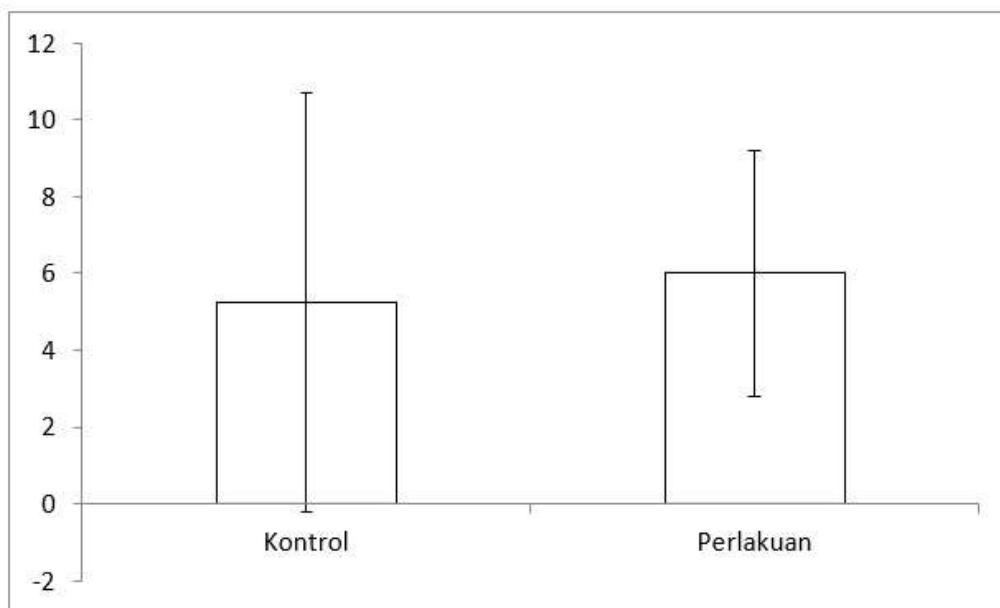
Sebanyak 27 ekor tikus percobaan dirusak saraf medula spinalis-nya menggunakan teknik *drilling*. Kematian tikus percobaan terjadi pada hari ke-1 dan 5 pascaoperasi berturut-turut sebanyak 3 dan 1 ekor. Sisanya, 23 ekor tikus percobaan memiliki gejala lumpuh total dan parsial berturut-turut sebanyak 8 dan 15 ekor. Selanjutnya, 2 hari pascapembedahan, tikus yang dibagi menjadi 2 perlakuan, yaitu tikus percobaan tidak diberikan pengobatan sebagai kontrol (diinjeksikan NaCl fisiologis steril) dan tikus percobaan yang diberikan pengobatan produk PT Dermama sebagai perlakuan. Dari 8 ekor tikus percobaan yang mengalami kelumpuhan total, 3 ekor tikus percobaan digunakan sebagai kontrol dan 5 ekor tikus percobaan digunakan sebagai perlakuan. Sementara itu, dari 15 ekor tikus yang mengalami gejala lumpuh parsial, 8 ekor tikus percobaan digunakan sebagai kontrol dan 7 ekor tikus percobaan digunakan sebagai perlakuan. Injeksi produk PT Dermama dilakukan secara intramuskular (IM) dengan dosis 0,07 mL/ekor.

Pengambilan data dilakukan 7 hari pasca aplikasi produk PT Dermama. Data yang diambil antara lain fungsi motorik, yang diamati dengan menghitung respons gerakan per satuan waktu. Tikus percobaan pada kelompok kontrol yang mengalami kelumpuhan total menunjukkan respons gerakan rata-rata sebesar $1,33 \pm 1,15$. Sementara itu, tikus percobaan kelompok perlakuan yang mengalami kelumpuhan total menunjukkan respons gerakan rata-rata sebesar $1,20 \pm 1,30$. Respons gerakan rata-rata pada kelompok kontrol lebih besar jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Selanjutnya, grafik respons gerakan rata-rata pada tikus percobaan yang mengalami kelumpuhan total disajikan pada Gambar 2.

Tikus percobaan yang mengalami kelumpuhan parsial pada kelompok kontrol menunjukkan respon gerakan rata-rata sebesar $5,25 \pm 5,44$. Sementara itu, tikus percobaan kelompok perlakuan yang mengalami kelumpuhan parsial menunjukkan respons gerakan rata-rata sebesar $6,00 \pm 3,27$. Respons gerakan rata-rata pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Perbedaan nilai respons gerakan rata-rata menunjukkan perbedaan persembuhan pada medula spinalis. Selanjutnya, grafik respon gerakan rata-rata pada tikus percobaan yang mengalami kelumpuhan parsial disajikan pada Gambar 3.



Gambar 2. Respons gerakan rata-rata pada tikus percobaan yang mengalami kelumpuhan total



Gambar 3. Respons gerakan rata-rata pada tikus percobaan yang mengalami kelumpuhan parsial

Saraf spinal mengandung serabut motorik dan sensorik. Setiap saraf spinal melekat pada medulla spinalis dengan radikls dorsal dan ventral. Radikls dorsalis merupakan tempat dari badan sel saraf dan serabut neuron sensorik. Serabut-serabut motorik (yang badan sel sarafnya terletak dalam massa abu-abu) menyilang radikls

ventral. Cedera pada saraf spinal dapat merusak fungsi sensorik dan fungsi motorik (Ariani, 2011). Metode *drilling* dapat menyebabkan kerusakan fungsi motorik. Terdapat dua macam kerusakan fungsi motorik yang terjadi, yaitu kelumpuhan total maupun parsial pada tikus percobaan. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan, aplikasi produk PT Dermama tidak memiliki efek terhadap tikus percobaan yang mengalami kelumpuhan total. Namun, pada tikus percobaan yang mengalami kelumpuhan parsial, aplikasi produk PT Dermama menunjukkan hasil positif. Persembuhan medula spinalis pada tikus percobaan lebih cepat pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Diferensiasi sel punca membutuhkan faktor penting yang diantaranya adalah faktor-faktor yang digunakan oleh Yamanaka. Faktor ini merupakan faktor transkripsi penting, yang terdiri dari 4 macam faktor yaitu Sox2, Klf4, Oct $\frac{3}{4}$ atau POU5F1, dan c-Myc (Imantika, 2014). Selain di dalam *stem cell*, faktor-faktor tersebut diduga juga terdapat pada sekreta *stem cell*, sehingga komponen ini juga mampu menginduksi *recovery* fungsi medula spinalis pada kelumpuhan tikus percobaan. Menurut Singhi dan Jain (2003), kelumpuhan parsial dalam 1-7 hari dapat berubah menjadi kelumpuhan total/komplit. Kelumpuhan parsial memiliki kemungkinan persembuhan lebih besar jika dibandingkan dengan kelumpuhan total.

Medula spinalis yang dirusak dengan metode *drilling* akan mengalami cedera yang diakibatkan oleh flexi, kompresi, hyperextension atau mekanisme rotasi-flexi. Hal tersebut termasuk kedalam kerusakan primer, sedangkan tanggapan tubuh untuk mengatasi kerusakan primer seperti peradangan, pendarahan, pelepasan substansi kimia termasuk kedalam kerusakan sekunder (Nas *et al.*, 2015). Ketidak mampuan tubuh untuk menanggapi kerusakan sekunder dapat menyebabkan kematian sel.

Kerusakan pada medula spinalis dapat mempengaruhi fungsi motorik dan sensoris. Tingkat keparahan cedera pada medula spinalis akan memengaruhi berapa banyak fungsi motorik dan sensoris yang masih dapat bekerja. Kelumpuhan yang diakibatkan oleh kerusakan medula spinalis dibagi menjadi dua, yaitu kelumpuhan total dan partial. Kelumpuhan total terjadi jika fungsi motorik dan sensoris hilang secara keseluruhan akibat kerusakan pada medula spinalis. Sementara itu, kelumpuhan partial terjadi jika fungsi motorik dan sensoris terganggu atau hilang namun tidak terjadi secara keseluruhan (Gibson, 2003).

Kerusakan pada medula spinalis akan menimbulkan reaksi inflamasi sehingga makrofag akan berada dalam medula spinalis. Makrofag akan memindahkan debris mielin dari medula spinalis yang mengalami kerusakan dan mendorong terbentuknya massa yang terdiri atas hormon pertumbuhan, sitokin, dan *growth-promoting surface molecules* (Kigerl *et al.*, 2009). Myelin yang hilang menyebabkan eliminasi pada akson

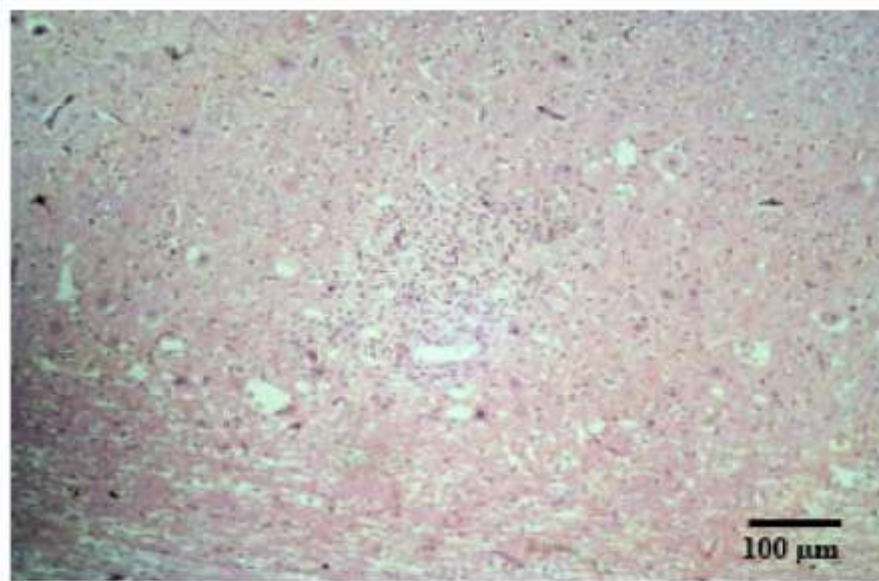
dan menghambat pemulihan medula spinalis. Makrofag umumnya dibagi dua, yaitu M1 dan M2. Makrofag M1 menghasilkan nitric oxide, sitokin proinflamasi, dan matrix metalloproteinases, yang menyebabkan kerusakan jaringan dan retraksi aksonal (Busch *et al.*, 2009). Sebaliknya, M2 makrofag *M2 activated* yang diaktifkan secara alternatif merespons interleukin-4 (IL-4) dan IL-13 dan terlibat dalam perbaikan jaringan (Kou *et al.*, 2011). Berdasarkan hasil penelitian Wu *et al.* 2018 pada medula spinalis tikus yang diberi perlakuan lebih banyak ditemukan oligo2-positive oligodendroglial. Selain itu, pada kelompok perlakuan ditemukan *double immunostained* dengan BrdU dan MBP, serta oligodendrosit matang dan menghasilkan myelin.

Sediaan yang diinjeksikan (*sekretom stem cell*) dapat mengurangi faktor peradangan. Kandungan *sekretom* dapat menurunkan kerusakan sekunder akibat kerusakan medula spinalis melalui aktivasi astrosit dan *scar formation* (Kang *et al.*, 2014). Selain itu, *sekretom stem cell* juga dapat merangsang regenerasi akson, aktivasi berbagai diferensial molekul, melakukan fungsi kemotaksis sel-sel radang, merangsang pembentukan buluh darah, dan menurunkan inaktivasi neuron. Menurunnya aktivitas makrofag menyebabkan penurunan jumlah myelin yang dari medula spinalis. Meningkatnya jumlah myelin dapat meningkatkan persembuhan medula spinalis. Pada Gambar 4. Dapat dilihat gambaran makroskopik medula spinalis tikus (dalam fiksasi buffer neutral formalin 10%), 7 hari pasca aplikasi *sekretom stem cell*, dimana terlihat lesio dikelilingi oleh zona berwarna hitam. Material ini selanjutnya diproses rutin dengan pewarnaan hematoxilin dan eosin/HE.

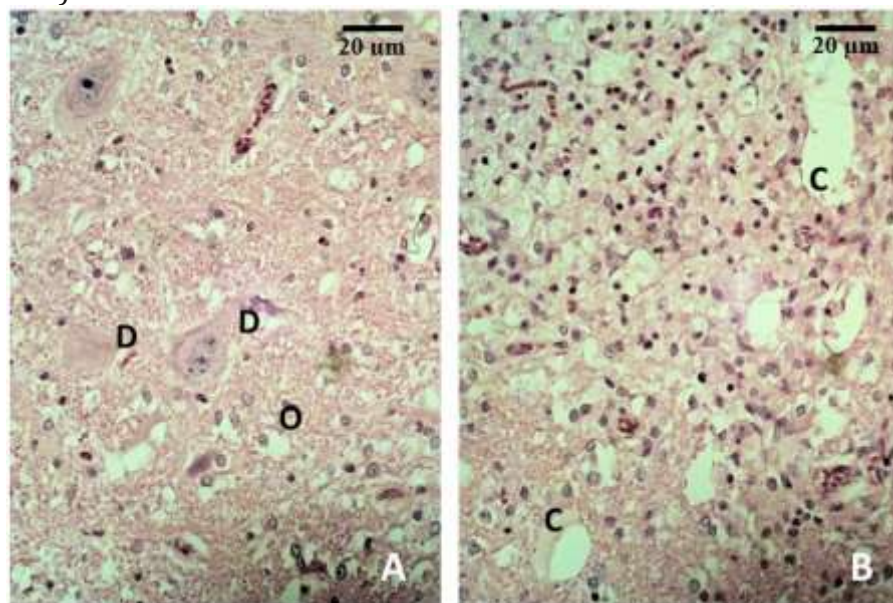


Gambar 4. Gambar makroskopik medula spinalis yang mengalami trauma (anak panah); material difiksasi dengan *buffer neutral formalin* 10%.

Hasil pewarnaan HE medula spinalis pasca kelumpuhan dan 7 hari pasca aplikasi *sekretom stem cell* menunjukkan adanya reaksi inflamasi yang didominasi oleh adanya infiltrasi sel-sel mononuklear disertai pembentukan vakuola atau sistik, degenerasi, dan nekrosis neuron (Gambar 5 dan 6 untuk hewan kontrol; Gambar 7 hingga Gambar 12 tikus yang diterapi dengan *sekretom stem cell*). Proliferasi sel-sel neuroglia atau oligodendroglia sangat jelas pada daerah peradangan (lesio), ditandai dengan selsel dengan inti bulat dan dikelilingi oleh area yang kosong (halo). Kondisi tersebut dinamakan "*gliosis*".



Gambar 5. Medula spinalis pascatrauma, terlihat respons degenerasi neuron dan nekrosis, infiltrasi sel-sel radang, dan pembentukan sistik. Pewarnaan HE).

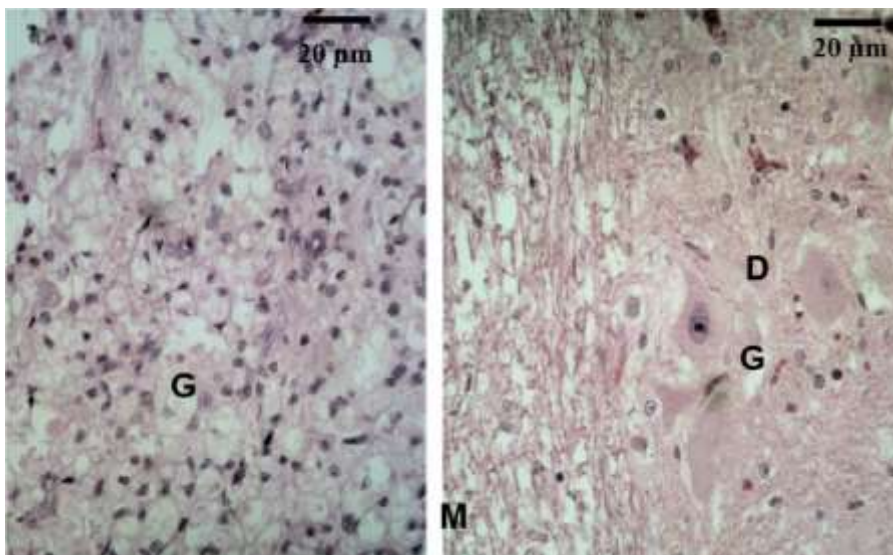


Gambar 6. Medula spinalis pascatrauma; ditandai dengan degenerasi neuron (D), oligodendrogliosis (O) dan pembentukan sistik. Pewarnaan HE.

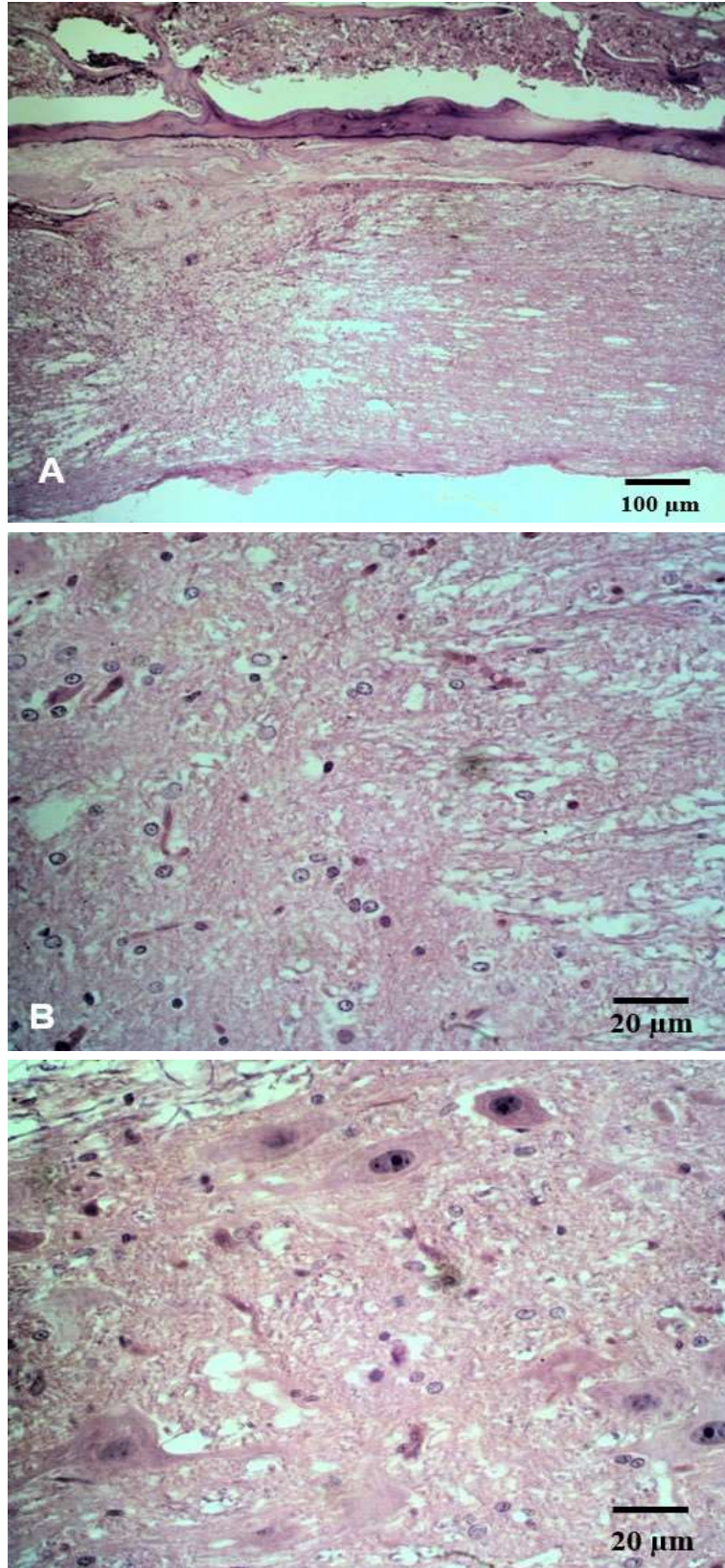
Untuk melihat keterlibatan sel-sel yang lain, dilakukan penegasan dengan pewarnaan imunohistokimia. Pada penelitian ini digunakan metode pewarnaan Streptavidin Biotin secara tidak langsung (*indirect SAB*). Ada tiga antibodi yang digunakan untuk mengevaluasi protein spesifik yang dimiliki oleh astrosit (*anti-glia fibrillary acidic protein/GFAP*), axon (*anti-S100 protein*) dan respon proliferasi sel (*anti-proliferating cell nucleic acid/PCNA*).



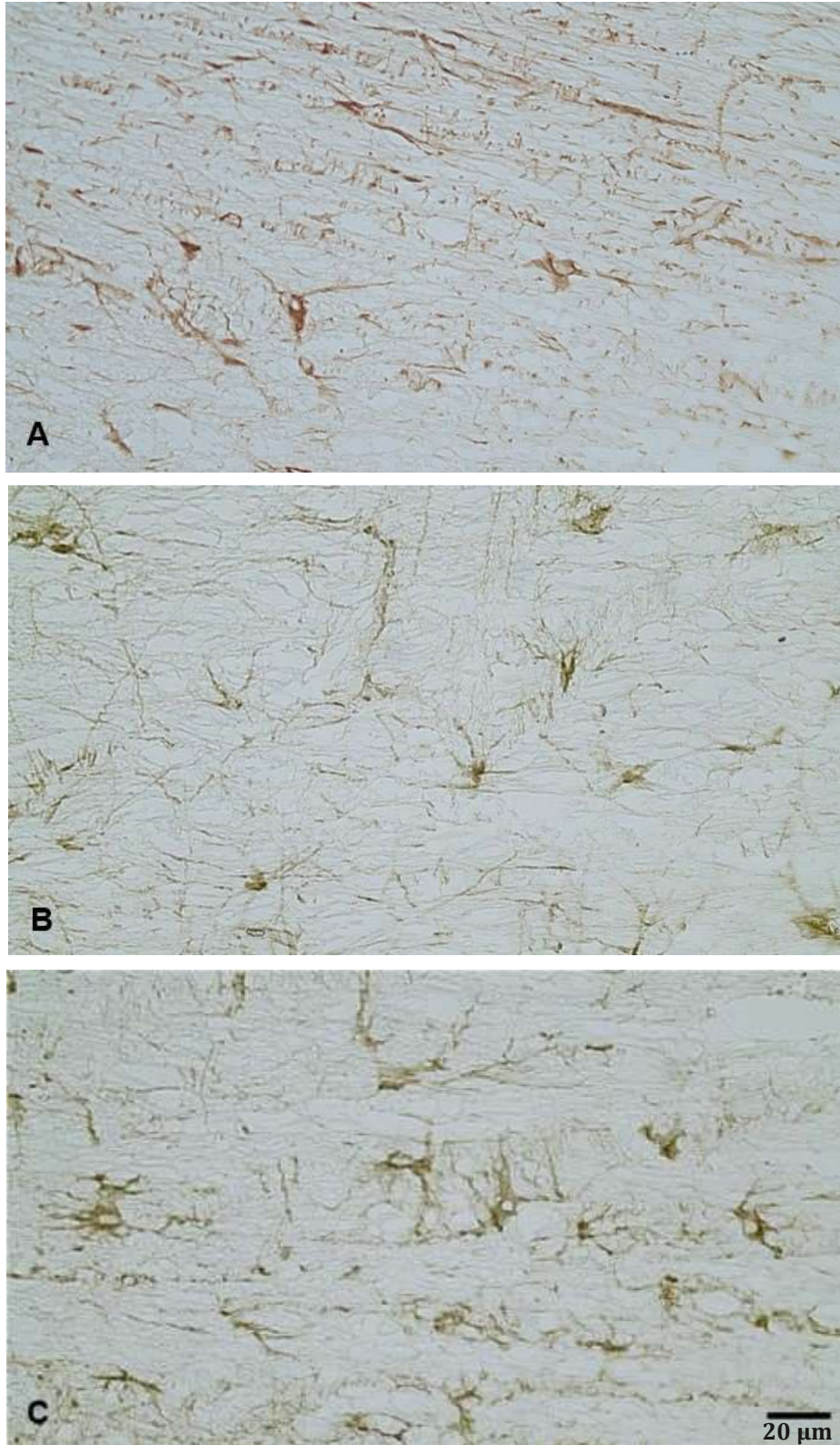
Gambar 7. Medula spinalis pasca trauma, satu minggu pasca aplikasi *sekretom stem cell*, dengan perbesaran rendah, masih ditemukan lesio. Pewarnaan HE.



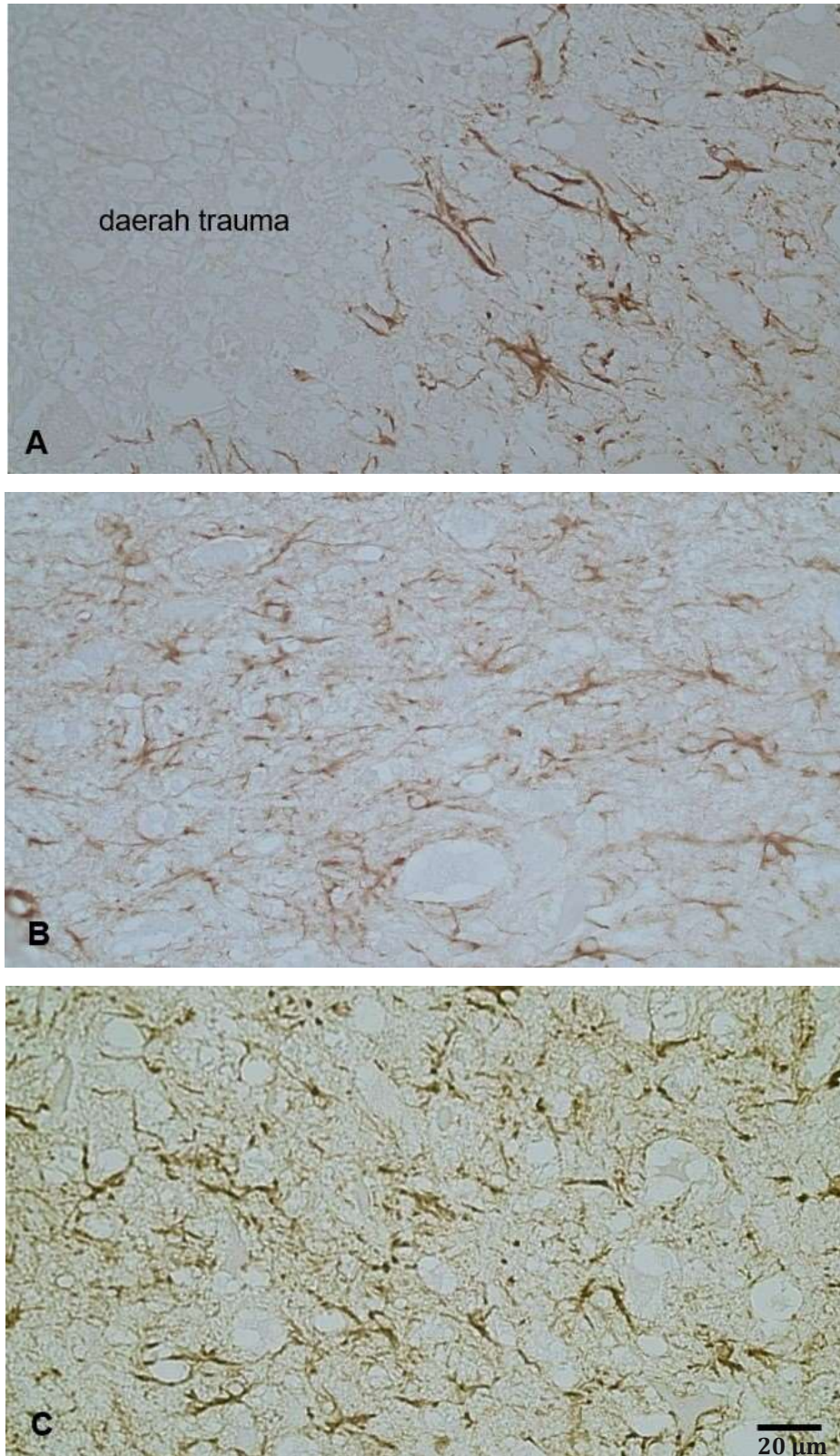
Gambar 8. Medula spinalis pasca trauma, satu minggu pasca aplikasi *sekretom stem cell*, respons demyelinasi axon (M), gliosis (G), dan degenerasi neuron (D) masih sangat jelas. Pewarnaan HE.



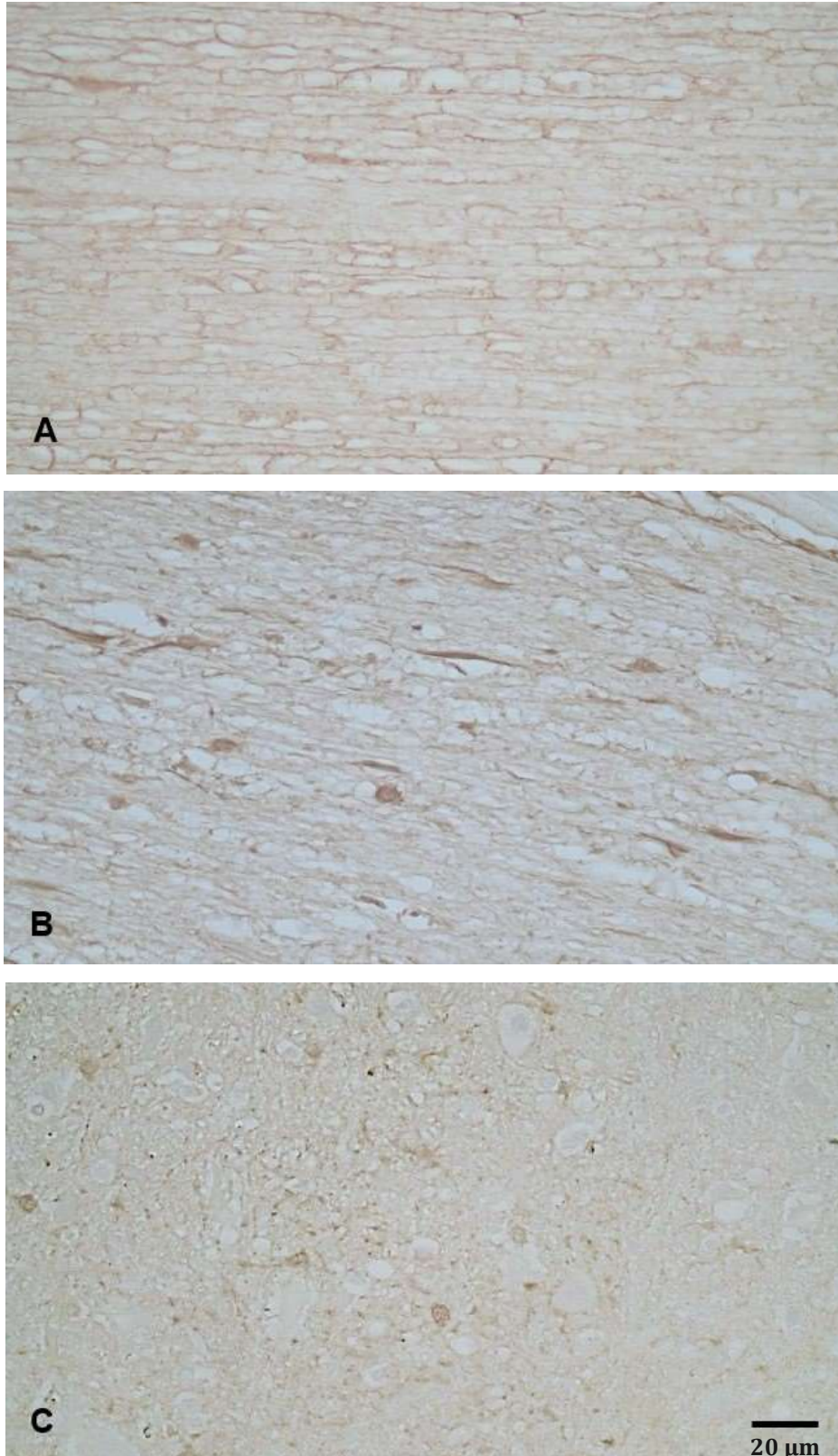
Gambar 9. Medula spinalis pasca trauma, dua minggu setelah aplikasi *sekretom stem cell*, area trauma masih jelas dengan perbesaran kecil (A). Degenerasi neuron dan pembentukan sistik berkurang (B dan C). Pewarnaan HE.



Gambar 10. *Medula spinalis*, kondisi astrokit pada substansia alba. Sel-sel astrokit menunjukkan respons positif terhadap keberadaan GFAP pada medula spinalis yang mengalami trauma (A), trauma dan satu minggu pasca aplikasi media *stem cell* (B) dan dua minggu aplikasi sekretom *stem cell* (C). Pewarnaan imunohistokimia metode *indirect SAB*.



Gambar 11. Medula spinalis di daerah sentral pasca trauma, pewarnaan imunohistokimia terhadap *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) atau mengetahui perkembangan sel-sel astrosit pasca aplikasi *sekretom stem cell*. (A) satu minggu pasca aplikasi *sekretom stem cell*, (B) dua minggu pasca aplikasi *sekretom stem cell*. Pewarnaan imunohistokimia *indirect SAB*.

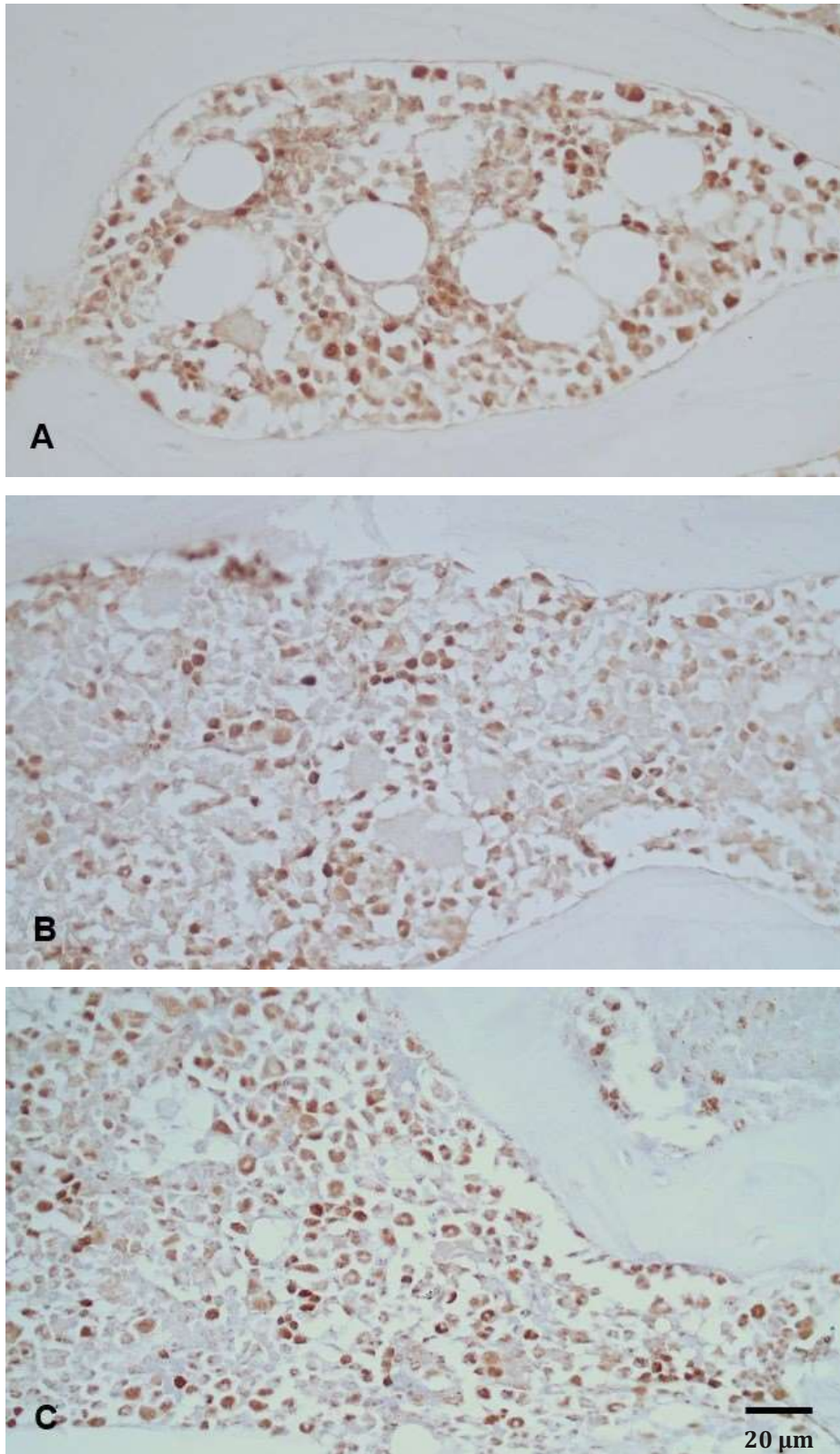


Gambar 12. Medula spinalis di perifer, menunjukkan medula spinalis yang divisualisasi dengan S 100 protein. Trauma menyebabkan hilangnya kelopak myelin/ demyelinasi (A), gambaran *demyelinasi* axon satu minggu setelah aplikasi *sekretom stem cell* (B) dan dua minggu setelah aplikasi *sekretom stem cell* (C). Pewarnaan imunohistokimia metode *indirect SAB*.

Beberapa sampel medula spinalis dari tikus yang mati (N1, N2, P, R, E, OP2, OP3, metode 3, 25 Okt) juga diambil dan diproses secara rutin dengan pewarnaan HE dilanjutkan dengan imunohistokimia. Hasil pewarnaan menunjukkan bahwa morfologi lesio traumatik maupun struktur sel tidak dapat diamati secara jelas. Proses autolisis pada organ saraf sangat cepat terjadi sehingga bila terjadi kematian seharusnya segera dilakukan fiksasi, yaitu tidak lebih dari 2 jam. Sebagai contoh, visualisasi sel-sel astrosit dengan GFAP tidak dapat utuh secara morfologi, sehingga hanya ditemukan *cell debris* yang bereaksi positif terhadap GFAP.

Aplikasi *sekretom stem cell* Produk PT Dermama pasca trauma pada medula spinalis hewan coba menunjukkan beberapa perubahan histopatologis. Trauma yang terjadi pada medula spinalis menyebabkan kerusakan dan terbentuk lesio (*glial scar* dan *fibrotic scar*), ditandai dengan kerusakan neuron (degenerasi dan nekrosis), infiltrasi sel-sel mononuklear, pembentukan vakuol-vakuol atau sistik yang menggambarkan kondisi malacia dan demyelinasi sel-sel syaraf. Evaluasi imunohistokimia menunjukkan bahwa pada daerah trauma tidak ditemukan sel atau terjadi hiposeluler dan dijumpai infiltrasi sel-sel radang mononuklear, sementara di sekitar kerusakan tersebut dikelilingi oleh sel-sel astrosit (sel-sel yang positif terhadap GFAP).

Sekretom stem cell diberikan secara lokal pada area trauma dengan harapan memberikan pengaruh positif terhadap *healing* melalui jalur sistemik yaitu perbaikan sirkulasi lokal. Pewarnaan imunohistokimia untuk mendeteksi keberadaan sel-sel yang sedang berproliferasi dilakukan dengan PCNA. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa dengan *marker* ini, sel-sel yang berlokasi di medula spinalis semuanya menunjukkan respons negatif. Kondisi ini memberikan pemahaman bahwa sel astrosit, neuroglia tidak menunjukkan aktivitas proliferasi pada sampel dari tikus yang diterapi setelah 7 atau 14 hari setelah trauma medula spinalis. Aplikasi *sekretom stem cell* untuk memengaruhi sel-sel lokal tampaknya terfokus pada sel-sel hematopoietik yang berlokasi pada sumsum tulang maupun bagian perifer matriks tulang (*osteoblast*). Pewarnaan imunohistokimia menggunakan PCNA memberikan hasil positif yang berwarna coklat (Gambar 13). Fenomena ini memberikan penjelasan bahwa kemungkinan *sekretom stem cell* memengaruhi secara tidak langsung proses *healing* pada medula spinalis.



Gambar 13. Kondisi sumsum tulang/*bone marrow* pada *vertebrae* di sekitar trauma medula spinalis. Sel-sel *hematopoietic* menunjukkan aktivitas proliferasi atau keberadaan *proliferating cell nucleic acid/PCNA*; pada kondisi trauma (A), satu minggu setelah aplikasi *sekretome stem cell* (B) dan dua minggu setelah aplikasi *sekretom stem cell* (C). Pewarnaan imunohistokimia metode indirect SAB.

Pemberian *sekretom stem cell* di bagian trauma akan menyebabkan proliferasi sel-sel hemopoietik di dalam sumsum tulang. Kondisi tersebut selanjutnya akan mengaktivasi sel-sel di dalam medula spinalis yang sedang dalam keadaan *glial scar* dan *fibrotic scar*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel-sel neuroglia, bahkan neuron di dalam medula spinalis tidak atau belum mengalami proliferasi selama satu atau dua minggu setelah *treatment*. Respons perkembangan proliferasi terfokus pada sel-sel hemopoietik di dalam sumsum tulang dan sel-sel di bagian perifer dari matriks tulang.

KESIMPULAN

1. Penelitian ini merupakan penelitian awal terkait cedera medula spinalis (SCI) sehingga masih diperlukan perbaikan metodologi, untuk dapat menginterpretasikan gambaran histologik yang lebih rinci.
2. Terdapat ketidak seragaman respons pada hewan coba dengan metode pencederaan medula spinalis yang telah digunakan, sehingga perlu diupayakan metode yang dapat distandarisasi.
3. Gambaran patologi-anatomis/ histopatologik pada hewan coba menunjukkan gambaran lesio umum yang terjadi pada cedera medula spinalis.
4. Secara umum, dari gambaran histopatologik menunjukkan bahwa aplikasi *sekretom stem cell* pascatrauma medula spinalis (pada kurun waktu penelitian 7-14 hari pascatrauma) menyebabkan respons proliferasi sel-sel pada sumsum tulang yang diduga akan memengaruhi aktivasi neuroglial pada medula spinalis.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariani TA. 2011. *Sistem Neurobehaviour*. Jakarta (ID): Salemba Medika.
- Blight AR. 1983. Axonal physiology of chronic spinal cord injury in the cat: intracellular recording in vitro. *Neuroscience* 10(4): 1471-1486.
- Bresnahan JC, King JS, and Martin GF. 1976. A neuroanatomical analysis of spinal cord injury in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J. Neurol. Sci.* 28(4): 521-542.
- Busch SA, Horn KP, Silver DJ. 2009. Overcoming macrophage-mediated axonal dieback following CNS injury. *J Neurosci.* 29: 9967-9976
- Corleto JA, Bravo-Hernandez M, Kota K, Osamu K, Santucci C, Navarro MR, Platoshyn O, Cizkova D, Lukacova N, Taylor J, Marsala M. 2015. Thoracic 9 Spinal Transection Induced Model of Muscle Spasticity in the Rat: A Systematic Electrophysiological and Histopathological Characterization. *Plos One.* 10(12):1-25. doi:10.1371/ journal.pone. 0144642.
- Dimarco AF, Dawson NV. 2014. Risk factors for mortality in spinal cord injury. *The Journal of Spinal Cord Medicine.* 37(6): 670-671
- Dohrman GJ, Wagner FC, and Bucy PC. 1971. The microvasculature in traumatic paraplegia. An electron microscopic study in the monkey. *J. Neurosurg.* 35(3): 263-271.
- Frisbie JH, and Sharma GVRK. 1992. Circadian rhythm of pulmonary embolism in patients with acute spinal cord injury. *Am. J. Cardiol.* 70: 847-848.
- Gibson KL. 2003. Caring for a patient who lives with a spinal cord injury. *Nursing.* 33: 36-41.
- Imantika E. 2014. Peran sel punca (*stem cells*) dalam mengatasi masalah infertilitas pada wanita. *Medula.* 2(2): 47-55.
- Kang W, Balordi F, Su N. 2014. Astrocyte activation is suppressed in both normal and injured brain by FGF signaling. *Proc Natl Acad Sci.* 111: 2987-2995.
- Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP. 2009. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci.* 29: 13435-13444.
- Kuo HS, Tsai MJ, Huang MC. 2011. Acid fibroblast growth factor and peripheral nerve grafts regulate Th2 cytokine expression, macrophage activation, polyamine synthesis, and neurotrophin expression in transected rat spinal cord. *J Neurosci.* 31: 4137-4147.
- Lee M, Makkar R. 2004. Stem cell transplantation in myocardial infarction: A status report. *Ann Intern Med.* 140(1): 37-729.
- Lukovic D, Moreno-Manzano V, Lopez-Mocholi E, Rodrigues-Jimenez FJ, Jendelova P, Sykova E, Oria M, Stojkovic M, Erceg S. 2015. Complete rat spinal cord

transection as a faithful model of spinal cord injury for translational cell transplantation.

Scientific Report. 5(9640):1-7. doi: 10.1038/srep09640.

Nas K, Yazmalar L, Şah V, Aydın A, Öneş K. 2015. Rehabilitation of spinal cord injuries. *World Journal of Orthopedics*, 6(1): 8-16. *Neurotology*. 10(4): 289-297.

Plumb DC. 2008. *Plumb's Veterinary Handbook*. Ed ke-6. Minnesota (US): Blackwell Publishing Professional.

Rivlin AS and Tator CH. 1977. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J. Neurosurg*. 47 (4): 577-581.

Saputra V. 2006. Dasar-dasar stem cell dan potensi aplikasinya dalam ilmu kedokteran. *Cermin Dunia Kedokteran* 153(1): 21-25.

Singhi P, Jain V. 2003. Bell's palsy in children. *Seminar in Pediatric*

Tator CH and Rowed DW. 1979. Current concepts in the immediate management of acute spinal cord injuries. *Can Med Assoc J*. 121(11): 1453-1464.

Wu B, Sun L, Li P, Tian M, Lou Y, Ren X. 2012. Transplantation of oligodendrocyte precursor cell improves myelination and promotes functional recovery after spinal cord injury. *Int Care Injured*. 43: 794-801.