

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ TERHADAP
EKSPRESI SITOKIN ANTI INFLAMASI (IL-4, IL-10, IL-13) PADA
CEDERA KOMPRESI KORDA SPINALIS AKUT**

Studi Eksperimental pada Tikus Sprague-Dawley Model Spinal Cord Injury



Oleh

Asadullah

NIM: 012015653056

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ TERHADAP
EKSPRESI SITOKIN ANTI INFLAMASI (IL-4, IL-10, IL-13) PADA
CEDERA KOMPRESI KORDA SPINALIS AKUT**

Studi Eksperimental pada Tikus Sprague-Dawley Model Spinal Cord Injury



Oleh

Asadullah

NIM: 012015653056

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2022

TESIS

**PENGARUH PEMBERIAN ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ TERHADAP
EKSPRESI SITOKIN ANTI INFLAMASI (IL-4, IL-10, IL-13) PADA
CEDERA KOMPRESI KORDA SPINALIS AKUT**

Studi Eksperimental pada Tikus Sprague-Dawley Model Spinal Cord Injury

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister

Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik

Pada Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Oleh

Asadullah

NIM: 012015653056

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

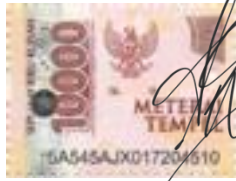
PERYATAAN ORISINALITAS

Karya ini adalah hasil karya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Asadullah, dr.

NIM : 012015653056

Tanda Tangan :



Tanggal : 10 Agustus 2022

LEMBAR PENGESAHAN

**PENGARUH PEMBERIAN ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ TERHADAP
EKSPRESI SITOKIN ANTI INFLAMASI (IL-4, IL-10, IL-13) PADA
CEDERA KOMPRESI KORDA SPINALIS AKUT**

TESIS INI TELAH DISETUJUI PADA

Tanggal, 10 Agustus 2022

Oleh:

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Abdul H. Bajamal, dr., Sp.BS(K)

NIP 19490408 197603 1 001

Pembimbing Kedua



Dr. Eko Agus Subagio, dr., Sp.BS(K)

NIP 19640902 199803 1 003

Mengetahui

Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik

Jenjang Magister Fakultas Kedokteran

Universitas Airlangga



Prof. Dr. Irwanto, dr., Sp. A (K)

NIP 19650227 199003 1 010

PENETAPAN PANITIA PENGUJI TESIS

Tesis ini akan diuji dan dinilai oleh Panitia Penguji pada

Program Magister Ilmu Kedokteran Klinik

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Pada tanggal : 30 April 2022

Panitia Penguji Tesis:

Ketua : 1. Dr. Muhammad Arifin Parenrengi, dr., Sp.BS (K)

Anggota : 2. Prof. Dr. Abdul H. Bajamal, dr., Sp.BS(K)

3. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., M.Si

4. Dr. Agusturchan, dr., Sp. BS (K)

5. Dr. Eko Agus Subagio, dr., M. Kes

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Asadullah

NIM : 012015653056

Program Studi : Magister Ilmu Kedokteran Klinik

Minat Studi : Ilmu Bedah Saraf

Judul Tesis : Pengaruh Pemberian ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ Terhadap
Ekspresi Sitokin Anti Inflamasi (IL-4, IL-10, IL-13) Pada
Cedera Kompresi Korda Spinalis Akut

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis saya ini adalah asli (hasil karya sendiri) bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (*plagiarism*) dari karya orang lain. Tesis ini belum pernah diajukan untuk mendapat gelar akademik.

Dalam tesis ini tidak terdapat pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar Pustaka. Demikian pernyataan ini dibuat tanpa paksaan dari pihak manapun. Apabila pernyataan ini tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan norma dan peraturan yang berlaku di Universitas Airlangga.

Surabaya, 10 Agustus 2022



Asadullah
NIM 012015653056

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui karya ilmiah saya dengan judul:

Pengaruh Pemberian ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ Terhadap Ekspresi Sitokin Anti Inflamasi (IL-4, IL-10, IL-13) Pada Cedera Kompresi Korda Spinalis Akut

Untuk dipublikasikan atau disampaikan di internet atau media lain yaitu *Digital Library* Perpustakaan Universitas Airlangga untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian Pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 10 Agustus 2022



Asadullah
NIM 012015653056

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis ucapkan ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan tesis yang berjudul **“Pengaruh Pemberian $ACTH_{4-10}Pro^8-Gly^9-Pro^{10}$ Terhadap Ekspresi Sitokin Anti Inflamasi (*IL-4*, *IL-10*, *IL-13*) Pada Cedera Kompresi Korda Spinalis Akut”** ini tepat pada waktunya.

Tesis ini disusun dalam kaitannya memenuhi tugas ilmiah dalam Program Studi Magister Ilmu Kedokteran Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Untuk itu pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Abdul H. Bajamal, dr., Sp.BS(K), selaku pembimbing yang telah banyak memberikan bimbingan dan sumbangan pemikiran.,
2. Dr. Eko Agus Subagio, dr., Sp.BS(K), selaku pembimbing yang telah banyak membimbing dan mengarahkan penelitian ini,
3. Keluarga saya, untuk semangat dan dukungan morilnya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.,
4. Rekan-rekan angkatan PPDS saya yang selalu memberikan dukungan,
5. Seluruh Staf Departemen Ilmu Bedah Saraf Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga – RSUD Dr. Soetomo yang selalu memberikan bimbingan akademis dan moril,
6. Seluruh keluarga besar PPDS Ilmu Bedah Saraf Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga – RSUD Dr. Soetomo yang selalu memberikan tempat bernaung untuk munculnya kesempatan menulis penelitian ini, dan

7. Semua pihak yang terlibat dalam penelitian ini yang tidak mungkin saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun dari seluruh pihak sangat penulis harapkan dalam rangka penyempurnaannya. Akhir kata, penulis berharap semoga hasil dari penelitian ini dapat bermanfaat dalam perkembangan ilmu kedokteran di bidang ilmu bedah saraf.

Surabaya, 10 Agustus 2022



Asadullah

PENGARUH PEMBERIAN $ACTH_{4-10}Pro^8-Gly^9-Pro^{10}$ TERHADAP EKSPRESI SITOKIN ANTI INFLAMASI (IL-4, IL-10, IL-13) PADA CEDERA KOMPRESI KORDA SPINALIS AKUT

Abstrak

Latar Belakang: Meskipun kejadiannya tidak sebanyak cedera kepala namun cedera korda spinalis sering kali menyebabkan disabilitas yang parah dan biasanya permanen. Patofisiologi cedera korda spinalis terdiri atas cedera primer dan cedera sekunder. Cedera sekunder terutama disebabkan oleh inflamasi paska trauma yang berujung pada terjadinya apoptosis dapat memperburuk cedera pada korda spinalis. Respon inflamasi dipengaruhi oleh sitokin baik yang bersifat proinflamasi maupun anti inflamasi. $ACTH_{4-10}Pro^8-Gly^9-Pro^{10}$ adalah heptapeptide dan analog sintetik dari fragmen hormone adrenokortikotropik (ACTH) yang dapat berikatan dengan reseptor melanocortin sehingga dapat memberikan efek anti inflamasi dan neuroprotektif. Pemberian $ACTH_{4-10}Pro^8-Gly^9-Pro^{10}$ diharapkan dapat meningkatkan ekspresi sitokin anti inflamasi (IL-4, IL-10, IL-13) pada cedera kompresi korda spinalis akut.

Metode: Dilakukan laminektomi pada segmen thoracal 2 tikus Sprague Dawley hingga mengekspos mielum, kompresi dilakukan dengan klip aneurisma dengan beban 20g dan 35g untuk merekonstruksi cedera kompresi ringan dan berat. $ACTH_{4-10}Pro^8-Gly^9-Pro^{10}$ diberikan secara intra nasal pada kelompok kontrol dan NaCl 0,9% diberikan pada kelompok plasebo. Kedua kelompok di biarkan hidup kemudian diterminasi pada jam ke 3 dan ke 6.

Hasil: Pada tikus dengan cedera kompresi ringan yang diberikan $ACTH_{4-10}Pro^8-Gly^9-Pro^{10}$ dan diterminasi jam ke-3 didapatkan ekspresi IL-4, IL-10 dan IL-13 yang lebih tinggi dibanding placebo, pada kelompok yang diterminasi jam ke-6 didapatkan peningkatan ekspresi IL-10 dan IL-13 dibanding placebo. Tikus dengan cedera kompresi berat didapatkan peningkatan ekspresi IL-10, IL-13 pada jam ke-3 dan IL-4, IL-10 pada jam ke-6.

Kesimpulan: Pemberian $ACTH_{4-10}Pro^8-Gly^9-Pro^{10}$ intra nasal dapat meningkatkan ekspresi sitokin anti-inflamasi pada hewan coba tikus Sprague Dawley dengan cedera kompresi ringan dan berat. Ekspresi sitokin anti inflamasi lebih besar pada cedera kompresi ringan dan jam ke-3. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mencari dosis optimal dan keluaran klinis setelah trauma kompresi ringan maupun berat.

Kata kunci: cedera korda spinalis akut, $ACTH_{4-10}Pro^8-Gly^9-Pro^{10}$, sitokin anti-inflamasi, IL-4, IL-10, IL-13

EFFECT of ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ on ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE (IL-4, IL-10, IL-13) EXPRESSION in ACUTE SPINAL CORD INJURY MODEL

Abstract

Background: Spinal cord injury (SCI) is a destructive neurological and pathological state that causes major motor, sensory and autonomic dysfunctions. It's final neurological outcome determined from both primary and secondary injury process. Neuroinflammation is a key component of the secondary injury mechanisms with local and systemic consequences. A neuroprotective compound, ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ also known as Semax has shown neuroprotective and anti-inflammatory properties. ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ also has actively used in the treatment of brain ischemia without serious complication reported. Here we analyzed the effects of ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ in regulating inflammatory cascade in SCI by looking at the expression of anti-inflammatory cytokine IL-4, IL-10, IL-13 in acute compression SCI.

Method: We do laminectomy in Sprague Dawley rats at the second thoracic vertebrae. After laminectomy we expose the myelum and create mild SCI model with 20gr and severe SCI with 35gr aneurysm clips. ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ was administered intranasally to the treatment group and 0,9% NaCl to the control group (placebo). Both group was remain alive and terminated at 3 and 6 hour. The preparations tissue sample were fixed in formalin and examined for immunohistochemistry. Quantitative measurement of anti-inflammatory cytokine (IL-4, IL-10, IL-13) was done in posterior horn with associated anti-monoclonal antibodies.

Result: Rats with mild SCI that were given ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ shown greater expression of IL-4, IL-10 and IL-13 at three hour post compression but only IL-10 and IL-13 elevated significantly at six hour. Rats with severe compression in ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ group shown greater expression of IL-10, IL-13 at three hour and IL-4, IL-10 at six hour compared with the placebo group.

Conclusion: Administration of ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ intranasal can increase anti inflammatory cytokine expression at Sprague Dawley rat model with mild and severe SCI. Expression of anti inflammatory cytokine was greater in mild compression and early hour (3 hour). Further research needs to be done to determine optimal dose and the actual clinical outcome in vivo.

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR ARTI, LAMBANG, SINGKATAN, DAN ISTILAH	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan umum.....	4
1.3.2 Tujuan khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat teoritis	5
1.4.2 Manfaat praktis	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Cedera Korda Spinalis	7
2.1.1 Epidemiologi.....	8
2.1.2 Anatomi	9
2.1.3 Patofisiologi.....	11
2.1.4 Klasifikasi	16
2.1.5 Tanda dan gejala	17
2.1.6 Tatalaksana	20
2.1.7 Komplikasi.....	21
2.2 Inflamasi	21
2.3 ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰	24
2.3.1 Neuroprotektif.....	25
2.3.2 Neurotropik.....	25
2.3.3 ACTH ₄₋₁₀ Pro ⁸ -Gly ⁹ -Pro ¹⁰ pada cedera korda spinalis.....	26
2.4 Model SCI pada Hewan Coba (Tikus <i>Sprague dawley</i>)	27
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	28
3.2 Hipotesis Penelititan	29
BAB 4 METODE PENELITIAN	31
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	31
4.2 Unit Eksperimen dan Replikasi	34
4.2.1 Unit eksperimen	34
4.2.2 Replikasi	35
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel	35
4.3.1 Variabel penelitian	35
4.3.2 Definisi operasional variabel penelitian	36
4.4 Materi Penelitian	36
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	36
4.5.1 Lokasi penelitian	36
4.5.2 Waktu penelitian	37
4.6 Pelaksanaan Penelitian.....	37

4.6.1 ACTH ₄₋₁₀ Pro ⁸ -Gly ⁹ -Pro ¹⁰	37
4.6.2 Pembuatan Hewan Model.....	37
4.6.3 Aklimatisasi Hewan Coba	38
4.6.4 Prosedur Pembiusan	38
4.6.5 Alat Kompresi.....	38
4.6.6 Pembuatan Blok Parafin Jaringan	39
4.6.7 Metode Deparafinisasi.....	39
4.6.8 Penghitugan ekspresi <i>IL-4</i>	40
4.6.9 Penghitugan ekspresi <i>IL-10</i>	40
4.6.10 Penghitugan ekspresi <i>IL-13</i>	41
4.7 Cara Pengolahan dan Analisis Data	41
4.8 Kerangka Operasional Penelitian	42
BAB 5 HASIL DAN ANALISIS DATA PENELITIAN	43
5.1 Gambaran Umum Penelitian	43
5.2 Ekspresi <i>IL-4</i> pada Pewarnaan IHC Blok Parafin Hewan Model Cedera Kompresi Akut Medula Spinalis.....	45
5.3 Hasil Uji Statistik Ekspresi <i>IL-4</i>	47
5.3.1 Hasil ekspresi <i>IL-4</i> pada kelompok SCI ringan.....	48
5.3.3 Hasil perbandingan ekspresi <i>IL-4</i> pada kelompok SCI ringan dan berat	52
5.4 Ekspresi <i>IL-10</i> pada Pewarnaan IHC Blok Parafin Hewan Model Cedera Kompresi Akut Medula Spinalis.....	53
5.5 Hasil Uji Statistik Ekspresi <i>IL-10</i>	55
5.5.1 Hasil ekspresi <i>IL-10</i> pada kelompok SCI ringan.....	56
5.5.2 Hasil ekspresi <i>IL-10</i> pada kelompok SCI berat	58
5.5.3 Hasil perbandingan ekspresi <i>IL-10</i> pada kelompok SCI ringan dan berat	60
5.6 Ekspresi <i>IL-13</i> pada Pewarnaan IHC Blok Parafin Hewan Model Cedera.....	61
5.7 Hasil Uji Statistik Ekspresi <i>IL-13</i>	63
5.7.2 Hasil ekspresi <i>IL-13</i> pada kelompok SCI berat	66
5.7.3 Hasil perbandingan ekspresi <i>IL-13</i> pada kelompok SCI ringan dan berat	68
BAB 6 PEMBAHASAN	69
6.1 Ekspresi <i>IL-4</i> pada Hewan Coba Tikus <i>Sprague-Dawley</i> dengan Perlakuan SCI ringan dan berat, pada jam ke-3 dan ke-6.....	71
6.2 Ekspresi <i>IL-10</i> pada Hewan Coba Tikus <i>Sprague-Dawley</i> dengan Perlakuan SCI ringan dan berat, pada jam ke-3 dan ke-6.....	73
6.3 Ekspresi <i>IL-13</i> pada Hewan Coba Tikus <i>Sprague-Dawley</i> dengan Perlakuan SCI ringan dan berat, pada jam ke-3 dan ke-6.....	74
6.4 Keterbatasan Penelitian	76
6.5 Temuan Baru	76
BAB 7 PENUTUP	78
7.1 Kesimpulan	78
7.2 Saran	79
DAFTAR PUSTAKA.....	80

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Profil demografi SCI	8
Tabel 2.2	Sitokin anti inflamasi.....	23
Tabel 5.1	Hasil dan analisis data berat badan tikus	43
Tabel 5.2	Hasil ekspresi <i>IL-4</i> pada hewan coba model SCI ringan.....	48
Tabel 5.3	Perbandingan ekspresi <i>IL-4</i> pada hewan coba model SCI ringan....	49
Tabel 5.4	Hasil ekspresi <i>IL-4</i> pada hewan coba model SCI berat.....	50
Tabel 5.5	Perbandingan ekspresi <i>IL-4</i> pada hewan coba model SCI berat.....	51
Tabel 5.6	Hasil ekspresi <i>IL-10</i> pada hewan coba model SCI ringan.....	56
Tabel 5.7	Perbandingan ekspresi <i>IL-10</i> pada hewan coba model SCI ringan..	57
Tabel 5.8	Hasil ekspresi <i>IL-10</i> pada hewan coba model SCI berat	58
Tabel 5.9	Perbandingan ekspresi <i>IL-10</i> pada hewan coba model SCI berat	59
Tabel 5.10	Perbandingan ekspresi <i>IL-13</i> pada hewan coba model SCI ringan..	65
Tabel 5.11	Perbandingan ekspresi <i>IL-13</i> pada hewan coba model SCI berat	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Anatomi penampang axial pada level medula spinalis cervical, T2, L1, L3, S1.....	9
Gambar 2.2	Jaras-jaras di dalam medula spinalis setinggi level thorakal.....	11
Gambar 2.3	Patofisiologi cedera primer dan sekunder korda spinalis setelah trauma.....	12
Gambar 2.4	Apoptosis sel	16
Gambar 2.5	Pemeriksaan standar dan klasifikasi cedera korda spinalis berdasarkan <i>American spinal injury association</i>	17
Gambar 2.6	Lokasi lesi pada sindroma-sindroma akibat lesi inkomplit cedera korda spinalis.....	20
Gambar 2.7	Proses reaksi inflamasi akibat sitokin-sitokin pro-inflamasi.....	22
Gambar 4.1	Rancangan penelitian	31
Gambar 5.1	Hasil pengecatan <i>IHC IL-4</i> penampang melintang medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI ringan	46
Gambar 5.2	Hasil pengecatan <i>IHC IL-4</i> penampang melintang medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI berat.	47
Gambar 5.3	Hasil penilaian ekspresi <i>IL-4</i> pada SCI ringan	48
Gambar 5.4	Hasil penilaian ekspresi <i>IL-4</i> pada SCI ringan	50
Gambar 5.5	Grafik perbandingan ekspresi <i>IL-4</i> pada tiap kelompok	52
Gambar 5.6	Hasil pengecatan <i>IHC IL-10</i> penampang melintang medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI ringan.....	54
Gambar 5.7	Hasil pengecatan <i>IHC IL-10</i> penampang melintang medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI berat.....	55
Gambar 5.8	Hasil penilaian ekspresi <i>IL-10</i> pada SCI ringan	56
Gambar 5.9	Hasil penilaian ekspresi <i>IL-10</i> pada SCI berat.....	58
Gambar 5.10	Grafik perbandingan ekspresi <i>IL-10</i> pada tiap kelompok	60
Gambar 5.11	Hasil pengecatan <i>IHC IL-13</i> penampang melintang medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI ringan.....	62
Gambar 5.12	Hasil pengecatan <i>IHC IL-13</i> penampang melintang medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI berat.....	63
Gambar 5.13	Hasil penilaian ekspresi <i>IL-13</i> pada SCI ringan	64
Gambar 5.14	Hasil penilaian ekspresi <i>IL-13</i> pada SCI berat.....	66
Gambar 5.15	Grafik perbandingan ekspresi <i>IL-13</i> pada tiap kelompok	68

DAFTAR ARTI, LAMBANG, SINGKATAN, DAN ISTILAH

AA	Asam Arakhidonat
ACTH	Adrenocorticotrophic Hormone
ACTH 4-10	ACTH 4-10 Pro ⁸ -Gly ⁹ -Pro ¹⁰
ALR	<i>AIM2-Like Receptors</i>
ASC	Adipose Stromal Cell
ASCI	<i>Acute Spinal Cord Injury</i>
ASIA	<i>American Spinal Injury Association</i>
ATP	Adenosine Triphosphate
BBB	Blood-Brain Barrier
BSCB	Blood-Spinal Cord Barrier
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
CNS	Central Nervous System
COX	Cyclooxygenase
CRH	Corticotrophic Releasing Hormone
CSF	Cerebrospinal Fluid
CSS	Cairan Serebrospinal
CSPG	Chondroitine Sulfate Proteoglycan
DAB	Diamino Benzidine
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECM	Extracellular Matrix
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAP	Growth Associated Protein
GFAP	Glial-Fibrillary-Acidic Protein
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HMGB1	High Mobility Group Box-1
HPA	Hypothalamus Pituitary Adrenal
HSP	Heat Shock Protein
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like Growth Factor
IKB	I Kappa Beta
IKK	IKB Kinase
IL	Interleukin
IRF	Interferon Regulatory Factor
IRI	Ischemia Reperfusion Injury
ISNCSCI	<i>The International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury</i>
JAK	Janus Activated Kinase
MAP	Microtubule Associated Protein
MBP	Myelin Basic Protein
MCR	Melanocortine Receptor
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MOG	Myelin-Oligodendrocyte Glycoprotein

MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MPSS	<i>Methylprednisolone Sodium Succinate</i>
MRNA	<i>Messenger-Ribonucleic Acid</i>
MS	<i>Multiple Sclerosis</i>
MSH	<i>Melanocyte Stimulating Hormone</i>
NASCIS	<i>National Acute Spinal Cord Injury Study</i>
NF	<i>Nuclear Factor</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NLR	<i>Nod-like Receptors</i>
NO	<i>Nitrit Oksida</i>
OPCS	<i>Oligodendrocyte Progenitor Cell</i>
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PGE	<i>Prostaglandin E</i>
PL	<i>Phospholipase</i>
PLA2	<i>Phospholipase A2</i>
POMC	<i>Pro-opiomelanocortine</i>
PRR	<i>Patterns Recognition Receptors</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycosylation End Products</i>
RAMP	<i>Resolution-Associated Molecular Pattern</i>
RLR	<i>Rig-1-like Recptors</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SAA	<i>Serum Amyloid</i>
SD	<i>Sprague Dawley</i>
SCI	<i>Spinal Cord Injury</i>
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activation of Transcription</i>
SSP	<i>Sistem Saraf Pusat</i>
TGF	<i>Tumor Growth Factor</i>
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
TH	<i>T-Helper</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRKB	<i>Tropomyosin Receptor Kinase B</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
XIAP	<i>X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Spinal cord injury (SCI) atau cedera korda spinalis adalah cedera yang menyebabkan perubahan pada fungsi motorik, sensori, atau autonom normal dari korda spinalis baik bersifat sementara atau permanen (Fehlings *et al.*, 2012). Pada tahun 2004 *National Spinal Cord Injury Statistical Center* (NSCISC), *University of Alabama* di Birmingham, Amerika melaporkan setiap tahunnya terdapat 11.000 insiden kasus baru traumatik SCI atau setidaknya 40 kasus per 1 juta populasi (Lim and Tow, 2007).

Cedera korda spinalis meskipun jumlahnya tidak sebanyak trauma kepala di Amerika yang dapat mencapai 235 per 100.000 penduduk, namun cedera korda spinalis sering kali menyebabkan disabilitas yang parah dan biasanya permanen. Kecacatan yang kemudian berujung pada menurunnya produktifitas, kualitas hidup, beban emosi dan ekonomi terhadap pasien maupun keluarganya (Lim *et al.*, 2007).

Dari data pada Rumah Sakit Umum Fatmawati dikatakan terdapat 104 kasus pada tahun 2014 yang terdiri dari 37 kasus akibat trauma, dan 67 kasus non trauma (Tulaar *et al.*, 2017). Data lain di dapatkan dari Rumah Sakit Dr. Soetomo, Surabaya pada tahun 2013-2017 didapatkan 442 pasien fraktur tulang belakang dan terbanyak terjadi pada laki-laki dari pada perempuan dengan perbandingan 3,3:1 (Widhiyanto *et al.*, 2019).

Seperti halnya trauma kepala, patofisiologi cedera korda spinalis juga terdiri atas cedera primer dan cedera sekunder. Cedera primer adalah cedera

akibat gaya pada saat terjadi trauma yang dapat berupa kompresi, laserasi, distraksi. Cedera korda spinalis paling sering disebabkan oleh trauma tumpul yang berujung pada terjadinya kompresi dan kontusi pada korda spinalis. Cedera sekunder merupakan serangkaian peristiwa sistemik, seluler dan molekular yang dipicu oleh cedera primer seperti iskemia, *glutaminergic excitotoxicity*, inflamasi dan apoptosis yang dapat memperburuk cedera pada korda spinalis. Intervensi dini untuk menghambat terjadinya cedera sekunder yang berujung pada apoptosis merupakan peluang terapi pada cedera korda spinalis (Fehling *et al.*, 2012).

Respon inflamasi dipengaruhi oleh sitokin baik yang bersifat proinflamasi (*IL-1, TNF, IFN-gamma, IL-12, IL-18*) maupun anti inflamasi (*IL-4, IL-10, IL-13*) (Cavaillon, 2001). Inflamasi yang terjadi pasca trauma dapat mengakibatkan apoptosis pada neuron, oligodendrosit dan juga pembentukan jaringan parut sehingga memperberat degenerasi fungsi neuronal. Metilprednisolone sebagai anti inflamasi dipercaya dapat memberikan efek neuroproteksi (Fehling *et al.*, 2012).

Sampai saat ini terapi farmakologis pada cedera korda spinalis yang pernah diteliti secara *Randomized Control Trial-RCT* adalah pemberian metilprednisolone (MPSS) dosis tinggi secara intravena (Fehling *et al.*, 2012) yang bekerja dengan jalan menekan proses inflamasi yang terjadi. Meskipun begitu pemberian MPSS masih diperdebatkan dan sampai saat ini belum di setujui oleh (*Food and Drug Administration*) FDA sebagai terapi standar pada SCI oleh karena efek samping seperti pneumonia nosokomial, infeksi saluran kemih, sepsis dan perdarahan gastrointestinal (Colaterais *et al.*, 2015).

ACTH4-10 (ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰) merupakan agen neuroprotektif yang telah banyak digunakan pada penderita stroke, cedera kepala dan Alzheimer.

Strukturnya mirip dengan melanokortin sehingga dapat berikatan dengan reseptor melanokortin dan memberikan efek anti inflamasi. Sampai saat ini belum ada data dan laporan mengenai efek samping yang serius dari penggunaannya (Kolomin *et al.*, 2013).

Pemberian *ACTH4-10* diketahui dapat menurunkan angka apoptosis sel neuron pada cedera kompresi korda spinalis akut pada tikus Sprague Dawley melalui peningkatan rasio *Bcl-2/HSP70* (Subagio, 2018). Selain itu dari penelitian lainnya diketahui pemberian *ACTH4-10* juga dapat menurunkan mediator pro-inflamasi *TLR-2*, *NF-kB*, *IL-8* dan *TNF- α* pada tikus Sprague Dawley dengan perlakuan cedera kompresi korda spinalis akut (Faris *et al.*, 2020).

Respon inflamasi yang terjadi pada cedera korda spinalis terutama diatur oleh makrofag yang terakumulasi di pusat cedera (Murray and Wynn, 2011). Makrofag mampu mengatur respon inflamasi melalui keseimbangan antara makrofag M1 dan M2, makrofag M1 menghasilkan mediator pro-inflamasi sedangkan M2 menghasilkan mediator anti-inflamasi, sehingga hasil akhir respon inflamasi sangat bergantung pada peningkatan ekspresi sitokin yang dihasilkan oleh M1 dan M2. Pemberian *ACTH4-10* dapat menurunkan sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan oleh M1 (Faris *et al.*, 2020).

Inflamasi yang menyebabkan terjadinya cedera sekunder paska cedera korda spinalis diketahui mulai terjadi pada jam ke 4 sampai ke 6 setelah trauma dan mencapai puncaknya pada jam ke 12 sampai ke 24 serta menurun setelah hari ke 5 (Carlson *et al.*, 1998; Taoka *et al.*, 1997). Berbeda dengan manusia pada tikus respon inflamasi sudah tampak pada jam ke 1 dan mencapai puncaknya pada jam ke 6 setelah trauma (Taoka *et al.*, 1997). Penelitian ini ditujukan untuk

mengetahui hubungan pemberian *ACTH4-10* dengan ekspresi sitokin anti-inflamasi (*IL-4*, *IL10*, *IL-13*) pada hewan model trauma kompresi ringan dan berat pada jam ke 3 serta jam ke 6 paska trauma.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang disusun dalam studi ini adalah.

1. Apakah ada perbedaan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, dan *IL-13* pada jam ke 3 setelah pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi ringan?
2. Apakah ada perbedaan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, dan *IL-13* pada jam ke 6 setelah pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi ringan?
3. Apakah ada perbedaan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, dan *IL-13* pada jam ke 3 setelah pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi berat?
4. Apakah ada perbedaan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, dan *IL-13* pada jam ke 6 setelah pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi berat?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui perbedaan ekspresi sitokin anti inflamasi (*IL-4*, *IL-10*, *IL-13*) setelah pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* pada cedera korda spinalis pasca kompresi ringan dan berat.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan bahwa pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi ringan mielum dapat meningkatkan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, dan *IL-13* pada jam ke 3.
2. Membuktikan bahwa pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi ringan mielum dapat meningkatkan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, dan *IL-13* pada jam ke 6.
3. Membuktikan bahwa pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi berat mielum dapat meningkatkan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, dan *IL-13* pada jam ke 3.
4. Membuktikan bahwa pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi berat mielum dapat meningkatkan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, dan *IL-13* pada jam ke 6.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi keilmuan tentang pengaruh pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* pada ekspresi sitokin anti-inflamasi *IL-4*, *IL-10*, *IL-13* pasca cedera kompresi korda spinalis ringan dan berat.

1.4.2 Manfaat praktis

Peningkatan ekspresi sitokin anti-inflamasi pada cedera kompresi korda spinalis ringan dan berat setelah pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-*

Pro10 dapat dijadikan dasar ilmiah penggunaan *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* sebagai terapi pada cedera korda spinalis akut.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Cedera Korda Spinalis

Cedera korda spinalis adalah cedera yang menyebabkan perubahan, baik bersifat sementara atau permanen, pada fungsi motorik, sensori, atau autonom normal dari korda spinalis (Fehling *et al.*, 2012). Pada tahun 2004 *National Spinal Cord Injury Statistical Center* (NSCISC), *University of Alabama* di Birmingham, USA melaporkan setiap tahunnya terdapat 11.000 insiden kasus baru traumatik SCI atau setidaknya 40 kasus per 1 juta populasi (Lim *et al.*, 2007). Cedera korda spinalis membebani masyarakat lebih dari 7 miliar dolar setiap tahunnya, dan menyebabkan penderitaan yang lebih besar terkait gangguan ambulansi, sensasi, BAB/BAK, dan fungsi seksual. Dimasa lampau pasien-pasien dengan cedera korda spinalis banyak yang mengalami kematian akibat komplikasinya namun kemajuan dalam perawatan suportif kini telah meningkat secara signifikan dan kelangsungan hidup pasien pasien dengan cedera korda spinalis juga ikut meningkat. Sampai saat ini tidak banyak yang bisa ditawarkan untuk memperbaiki disabilitas pasien pasien dengan cedera korda spinalis, namun dengan perkembangan dan pemahaman yang semakin baik dari mekanisme cedera korda spinalis beberapa dekade terakhir ini mulai muncul terapi terapi yang meskipun masih dalam fase awal percobaan klinis namun menunjukkan hasil yang menjanjikan (Wang *et al.*, 2017).

2.1.1 Epidemiologi

Setiap tahunnya di USA diperkirakan rata rata ada 40 kasus baru setiap 1 juta penduduk, dengan jumlah penduduk saat ini diperkirakan ada 12.000 kasus baru setiap tahunnya. Kebanyakan terjadi pada laki laki dengan rasio antara laki laki dan perempuan 4:1. Sekitar 22-50% pasien dilaporkan positif mengkonsumsi alkohol. Penyebab tersering dari cedera korda spinalis dapat dikelompokkan menjadi lima kategori: kecelakaan lalu lintas, kekerasan, jatuh dari ketinggian, olah raga (Fehling *et al.*, 2012).

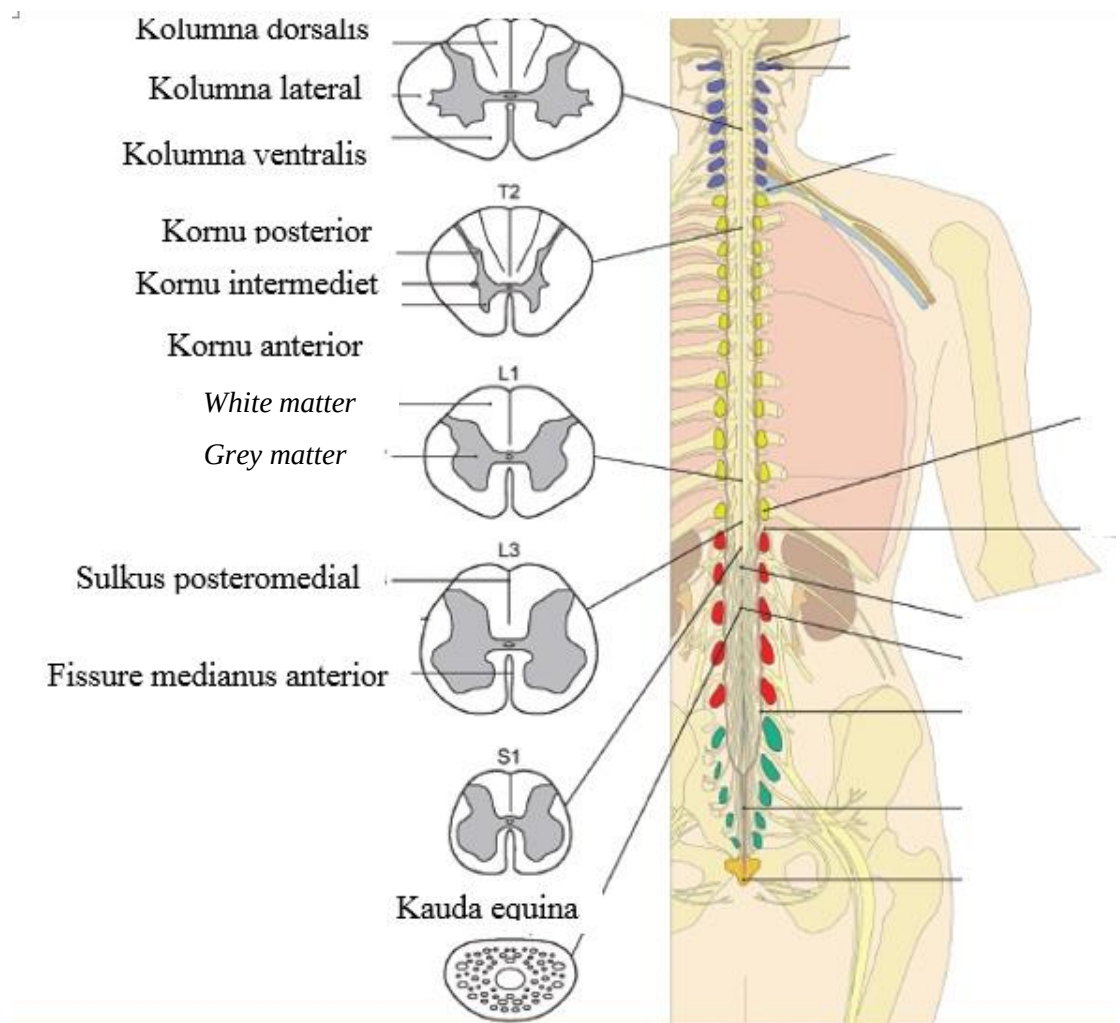
Dengan semakin majunya teknologi dan perawatan suportif, angka cedera korda spinalis semakin meningkat dari tahun 1973-1979 sebanyak 4563 kasus, tahun 1980-1989 10.271 kasus, tahun 1990-1999 12.585 kasus dengan median usia 35,3 th (Fehling *et al.*, 2012).

Tabel 2.1 Profil demografi SCI (Fehling *et al.*, 2012)

Karakteristik	Tahun			
	1973-1979	1980-1989	1990-1999	2000-2009
Total kasus SCI	4563	10271	12585	10070
Usia				
Rerata (tahun)	28.9	31.5	35.3	38.1
% $\geq$ 65 tahun	3.1	4.9	7.8	8.8
Seks: % wanita	18.2	17.6	19.8	21.2
Ras/etnis (%)				
<i>Non-Hispanic White</i>	76.8	68.2	59.8	64.7
<i>Non-Hispanic Black</i>	14.2	20.4	24.3	20.0
<i>Hispanic Origin</i>	6.0	8.4	12.3	11.9
Lain-lain	3.0	3.0	3.6	3.4
Etiologi (%)				
Kecelakaan lalu lintas	46.9	44.4	40.8	46.5
Jatuh	16.5	18.5	20.6	24.0
Kekerasan	13.3	16.9	21.8	12.2
Olahraga	14.3	12.3	8.5	9.5
Lain-lain	9.0	7.9	8.3	7.8

2.1.2 Anatomi

Korda spinalis merupakan bagian dari susunan saraf pusat (SSP). Terbantang dari foramen magnum sampai dengan L1, di L1 melonjong dan agak melebar yang disebut konus terminalis atau konus medularis. Terbantang dibawah konus terminalis, serabut bukan saraf yang disebut filum terminal yang merupakan jaringan ikat (Fehling *et al.*, 2012).

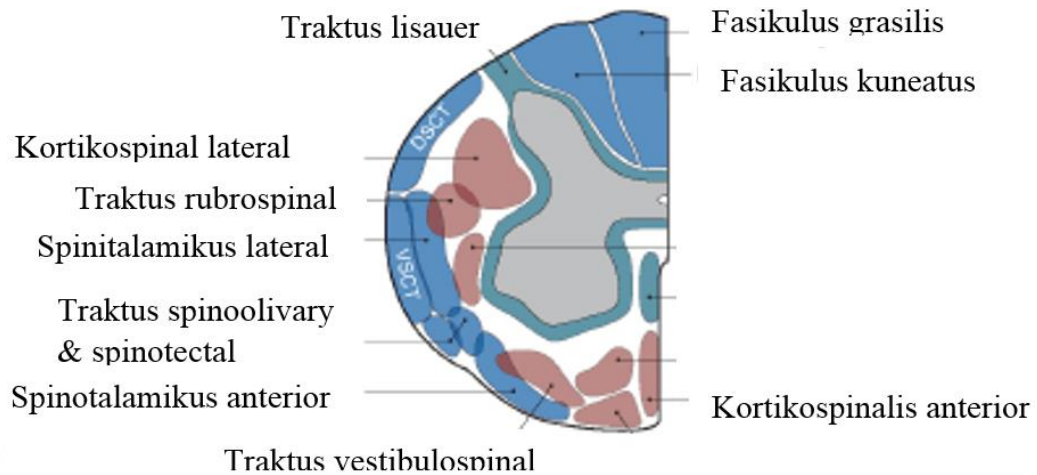


Gambar 2.1 Anatomi penampang axial pada level medula spinalis cervical, T2, L1, L3, S1 (Fehling *et al.*, 2012)

Terdapat 31 pasang saraf spinal: 8 pasang saraf servikal, 12 pasang saraf torakal, 5 pasang saraf lumbal, 5 pasang saraf sakral dan 1 pasang saraf koksigeal. Akar saraf lumbal dan sakral terkumpul yang disebut dengan kauda equina. Setiap pasangan saraf keluar melalui foramen intervertebralis. Saraf spinal dilindungi oleh tulang vertebra dan ligamen dan juga oleh selaput meningen spinal dan CSF (Fehling *et al.*, 2012).

Struktur internal medula spinalis terdiri dari substansi abu abu dan substansi putih (Gambar 2.2). Substansi abu-abu berbentuk kupu-kupu dikelilingi bagian luarnya oleh substansi putih. Terbagi menjadi bagian kiri dan kanan oleh fisura median anterior dan median septum yang disebut dengan posterior median septum (Fehling *et al.*, 2012).

Keluar dari medula spinalis merupakan akar ventral dan dorsal dari saraf spinal. Substansi abu-abu mengandung badan sel dan dendrit dan neuron efferen, akson tak bermyelin, saraf sensoris dan motoris dan akson terminal dari neuron. Substansi abu-abu berbentuk huruf H dan terdiri dari tiga bagian yaitu: anterior, posterior dan komisura abu-abu. Bagian posterior sebagai input/afferent, anterior sebagai output/efferent, komisura abu-abu untuk refleks silang dan substansi putih merupakan kumpulan serat saraf bermyelin (Fehling *et al.*, 2012).

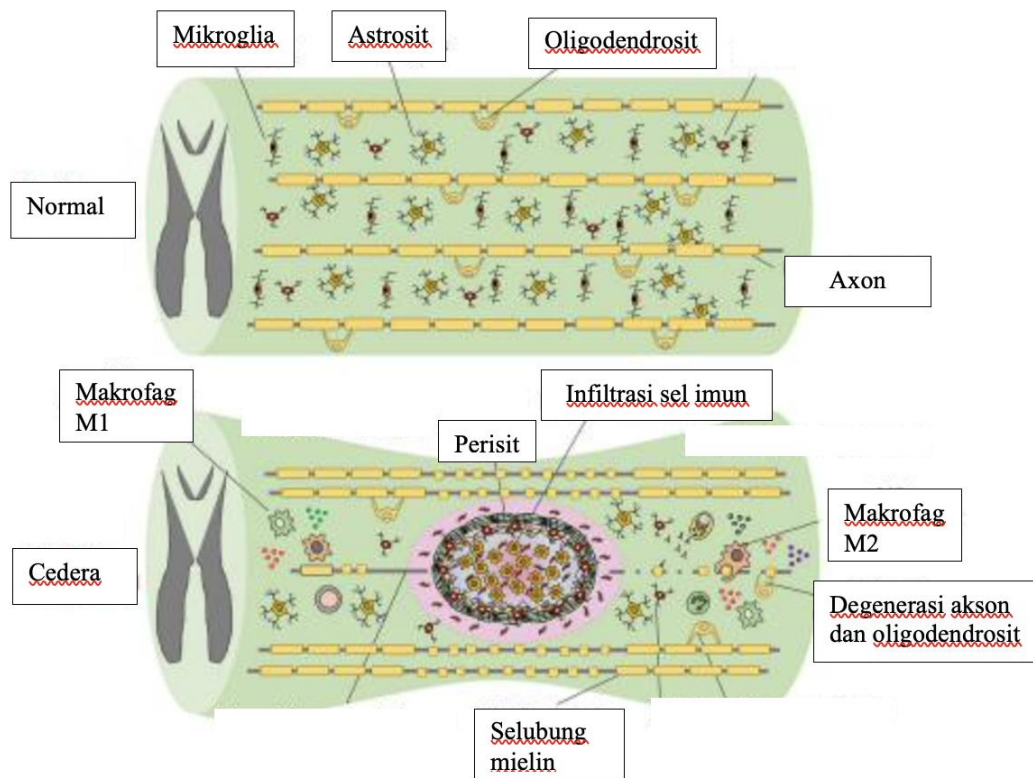


Gambar 2.2 Jaras-jaras di dalam medula spinalis setinggi level thorakal (Fehling *et al.*, 2012)

2.1.3 Patofisiologi

2.1.3.1 Cedera primer dan cedera sekunder

Patofisiologi SCI secara konseptual dapat dibagi menjadi dua fase kritis, cedera primer yang terjadi sesaat setelah trauma dan cedera sekunder yang terjadi berikutnya dan berujung pada kematian sel-sel di jaringan spinal cord. Cedera sekunder diakibatkan oleh serangkaian proses yang saling berkaitan dan menyebabkan kerusakan jaringan progresif selama berminggu minggu bahkan bertahun tahun setelahnya. Cedera sekunder dapat disebabkan oleh proses vasospasme, iskemia lokal, apoptosis, neuroinflamasi, eksotoksisitas serta radikal bebas. Secara teoritis, cedera sekunder menyediakan jendela untuk intervensi terapeutik (Wang *et al.*, 2017).



Gambar 2.3 Patofisiologi cedera primer dan sekunder korda spinalis setelah trauma (Fehling *et al.*, 2012)

Terdapat empat mekanisme cedera primer pada medula spinalis, pertama adalah dampak cedera yang disebabkan kompresi persisten, yang umumnya terjadi akibat fragmen tulang yang menyebabkan kompresi pada spinal, fraktur dislokasi, dan ruptur diskus akut. Kedua, dampak cedera disertai kompresi sementara, dapat terjadi misalnya pada seseorang dengan penyakit degeneratif tulang cervical yang mengalami cedera hiperekstensi. Ketiga adalah cedera yang disebabkan distraksi, yaitu terjadi jika kolumna spinalis teregang berlebihan pada bidang aksial akibat distraksi yang dihasilkan dari gerakan fleksi, ekstensi, rotasi atau adanya dislokasi yang menyebabkan pergeseran atau peregangan dari medula spinalis dan atau asupan darahnya. Biasanya mekanisme seperti ini tanpa disertai kelainan radiologis seperti pada umumnya terjadi pada anak-anak dimana vertebranya masih terdiri dari tulang rawan, ototnya masih belum berkembang

sempurna dan ligamennya masih lemah. Pada orang dewasa, cedera medula spinalis tanpa disertai kelainan radiologis umumnya terjadi pada seseorang dengan penyakit degeneratif tulang belakang. Keempat yaitu laserasi atau transeksi, yang dapat terjadi akibat luka tembak, dislokasi fragmen tulang tajam, atau distraksi yang parah. Laserasi dapat terjadi dalam berbagai derajat mulai dari cedera yang ringan sampai transeksi lengkap (Subagio, 2018).

Cedera primer yang terjadi cenderung merusak pusat substansia grisea dan sebagian mengenai substansia alba. Hal tersebut terjadi karena, konsistensi substansia grisea lebih lunak dan banyak vaskularisasi. Pada cedera primer, tahap awal akan terjadi perdarahan pada medula spinalis dilanjutkan dengan terganggunya aliran darah medula spinalis menyebabkan hipoksia dan iskemia sehingga terjadi infark lokal. Hal ini menyebabkan substansia grisea rusak (Subagio, 2018).

Kerusakan pada substansia grisea terutama karena kebutuhan metaboliknya yang tinggi. Saraf yang mengalami trauma secara fisik terganggu dan ketebalan myelinnya berkurang. Perdarahan mikro atau edema di sekitar saraf yang mengalami cedera, dapat menyebabkan saraf tersebut semakin terganggu. Hal tersebut yang mendasari pemikiran bahwa substansia grisea mengalami kerusakan yang ireversibel selama satu jam pertama, sedangkan substansia alba mengalami kerusakan selama 72 jam setelah cedera (Subagio, 2018).

Segera setelah terjadi cedera medula spinalis, fungsi disertai perubahan patologis akan hilang secara sementara. Pada permulaan terjadinya cedera memicu timbulnya kaskade yang terdiri dari akumulasi produksi asam amino, neurotransmitter, zat vasoaktif, radikal bebas oksigen dan produk dari peroksidasi

lipid. Program jalur kematian sel juga teraktivasi. Terjadi kehilangan darah dari barier medula akibat edema dan peningkatan tekanan jaringan. Selama berlangsungnya perdarahan pada medula, maka suplai darah menjadi terbatas, sehingga menyebabkan iskemia yang mengakibatkan kerusakan medula lebih lanjut sehingga timbul cedera sekunder. Cedera sekunder meliputi syok neurogenik, gangguan vaskular seperti perdarahan dan reperfusi-iskemia, eksitotoksisitas, cedera primer yang dimediasi kalsium dan gangguan cairan elektrolit, trauma imunologik, apoptosis, gangguan fungsi mitokondria dan proses lainnya (Subagio, 2018).

2.1.3.2 Kerusakan sel pada cedera korda spinalis

Kematian sel pada cedera korda spinalis dapat terjadi melalui proses nekrosis maupun apoptosis. Apoptosis atau kematian sel yang terprogram memerlukan ATP dan sintesis protein sehingga menyediakan peluang terapi untuk menghentikan proses apoptosis.(Dumont *et al.*, 2001) Oligodendrosit sangat rentan terhadap proses apoptosis 1- 7 hari pertama setelah cedera. Apoptosis pada oligodendrosit terjadi tidak hanya pada tempat lesi namun juga terjadi pada bagian yang jauh dari pusat cedera. Keadaan ini menyebabkan demielinisasi akson yang tersisa dan transmisi neuron, sehingga menyebabkan gangguan fungsi neuron.(Fehling *et al.*, 2012)

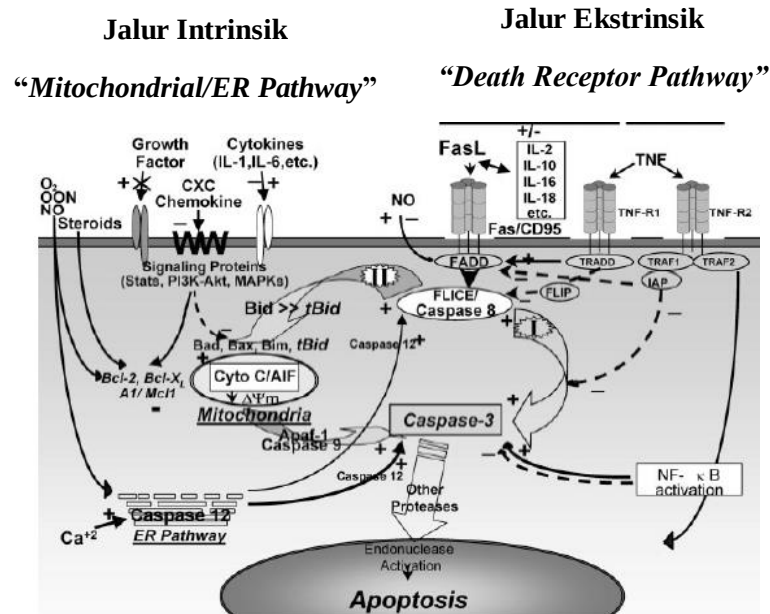
Dua jalur utama apoptosis, baik ekstrinsik dan intrinsik saat ini telah diketahui dengan baik, dan keduanya tampak aktif pada cedera medula spinalis. Jalur ekstrinsik apoptosis ditimbulkan oleh sinyal ekstraselular, diperankan terutama oleh *tumor necrosing factor* (TNF). *Tumor necrosing factor* terakumulasi dengan cepat pada cedera medula spinalis, dan aktivasi reseptor Fas

dari neuron, mikroglia, dan oligodendrosit memicu sebuah program lanjutan dari aktivasi caspase yang melibatkan caspase-8 sebagai caspase pemicu dan caspase-3 dan caspase-6 sebagai caspase efektor. Aktivasi dari efektor caspase menyebabkan kematian dari sel yang terkena. Pemicu alternatif lain dari jalur ekstrinsik memicu sintesis dari nitric oxide, yang juga dapat mengaktivasi caspase 3 dengan hasil berupa kematian sel yang terprogram. Jalur intrinsik apoptosis diaktivasi oleh sinyal-sinyal intraselular, oleh karena itu disebut sebagai jalur intrinsik. Aktivasi dari jalur intrinsik pada saraf setelah cedera medula spinalis menimbulkan konsentrasi tinggi dari kalsium intraneuron menyebabkan kehancuran mitokondria, pelepasan sitokrom c, dan diikuti oleh aktivasi dari jalur alternatif aktivasi caspase. Pada saat hal tersebut terjadi sitokrom c berpasangan dengan apoptosis *activating* tor-1 untuk mengaktivasi caspase-9, pemicu caspase, yang mana terdapat pada jalur ekstrinsik, mengaktivasi caspase-3 dan caspase-6 sebagai efektor caspase, menyebabkan kematian serabut neuron yang terkena. Saat ini, cedera sekunder yang berupa apoptosis pada cedera medula spinalis telah dipahami secara teliti sehingga memberikan kesempatan untuk penemuan terapi baru yang teruji kedepannya. (Kirshblum *et al.*, 2011)

Jalur intrinsik secara keseluruhan dipengaruhi oleh stress selular yang dapat diakibatkan oleh banyak faktor seperti kerusakan *deoxyribonucleic acid* (DNA), kurangnya growth faktor, radikal bebas, radiasi ion dan lain lain. Kareanya hal hal yang dapat memicu timbulnya radikal bebas seperti inflamasi harus dicegah sehingga apoptosis sel tidak terjadi. (Haanen *et al.*, 1995)

Jalur ekstrinsik dapat di picu oleh berbagai molekul yang biasa disebut ligand yang berikatan dan mengaktifkan reseptor kematian sel. Molekul ini

diantaranya Fas ligand dan $\text{TNF-}\alpha$. Berikutnya aktivasi reseptor ini akan mengaktifkan caspase 8 dan memulai proses apoptosis.(Wang *et al.*, 2017)



Gambar 2.4 Apoptosis sel (Anwar *et al.*, 2016)

2.1.4 Klasifikasi

Metode klasifikasi menurut *American Spinal Injury Association (ASIA)* berdasarkan hubungan antara kelengkapan dan level cedera dengan defisit neurologis yang timbul (Dumont *et al.*, 2001):

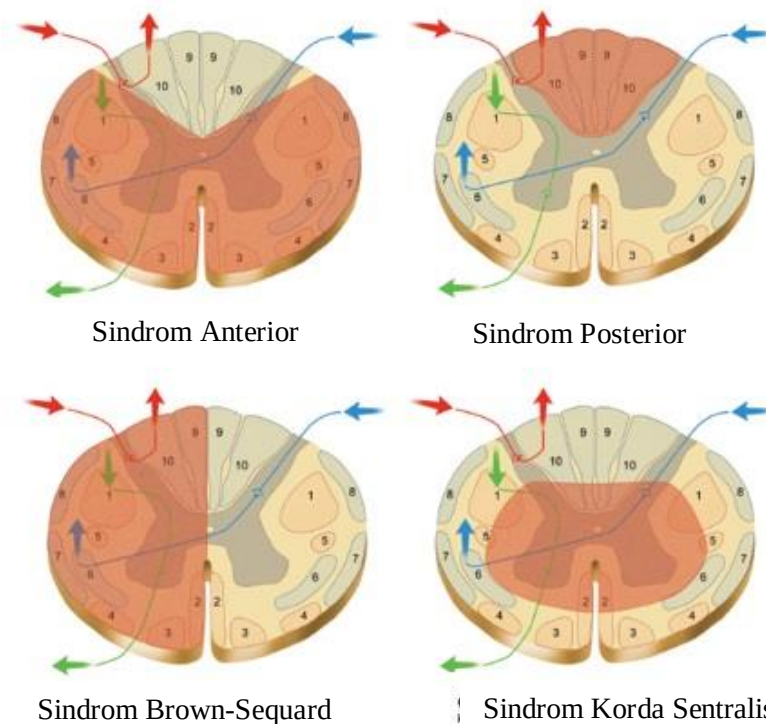
- (A) Komplit: Tidak ada fungsi motorik dan sensorik yang tersisa pada segmen sakral S4-S5
- (B) Inkomplit: Terdapat fungsi sensorik tanpa fungsi motorik di bawah lesi termasuk segmen sakral S4-S5.
- (C) Inkomplit: Terdapat fungsi motorik di bawah lesi dan lebih dari separuh memiliki kekuatan otot kurang dari 3.

Cedera medula spinalis akibat luka tembus, penekanan maupun iskemik dapat menyebabkan berbagai bentuk karakteristik cedera berdasarkan anatomi dari terjadinya cedera. Defisit neurologis yang timbul (fungsi yang hilang atau tersisa) dapat digambarkan dari pola kerusakan medula dan radiks dorsalis demikian juga sebaliknya, antara lain (Fehling *et al.*, 2012):

1. Lesi Komplit yaitu terjadinya cedera medula yang luas akibat anatomi dan fungsi transeksi medula disertai kehilangan fungsi motorik dan sensorik dibawah lesi. Mekanisme khasnya adalah trauma vertebra subluksasi yang parah mereduksi diameter kanalis spinalis dan menghancurkan medula. Konsekuensinya bisa terjadi paraplegia atau quadriplegia (tergantung dari level lesinya), rusaknya fungsi otonomik termasuk fungsi BAB, BAK dan sensorik.
2. Lesi Inkomplit
 - a. Sindroma medula anterior. Gangguan ini akibat kerusakan pada separuh bagian ventral medula (traktus spinotalamik dan traktus kortikospinal) dengan kolumna dorsalis yang masih intak dan sensasi raba (propioseptif), tekan dan posisi masih terjaga, meskipun terjadi paralisis motorik dan kehilangan persepsi nyeri (nosiseptif dan termosepsi) bilateral. Hal tersebut disebabkan mekanisme herniasi diskus akut atau iskemia dari oklusi arteri spinal.
 - b. Sindrom Brown Squard. Lesi terjadi pada medula spinalis secara ekstensif pada salah satu sisi sehingga menyebabkan kelemahan (paralisis) dan kehilangan kontrol motorik, perasaan propioseptif ipsilateral serta persepsi

nyeri (nosiseptif dan termosepsi) kontralateral di bawah lesi. Lesi ini biasanya terjadi akibat luka tusuk atau tembak.

- c. Sindrom medula sentral. Sindroma ini terjadi akibat dari cedera pada sentral medula spinalis (substansia grisea) servikal seringkali disertai cedera yang konkusif. Cedera tersebut mengakibatkan kelemahan pada ekstremitas atas lebih buruk dibandingkan ekstremitas bawah disertai parestesi, namun, sensasi perianal serta motorik dan sensorik ekstremitas inferior masih terjaga karena distal kaki dan serabut saraf sensorik dan motorik sakral sebagian besar terletak di perifer medula servikal. Lesi ini terjadi akibat mekanisme kompresi sementara dari medula servikal akibat ligamentum flavum yang tertekuk selama trauma hiperekstensi leher. Sindroma ini muncul pada penderita stenosis servikal.
- d. Sindroma konus medularis. Cedera pada regio torakolumbar dapat menyebabkan sel saraf pada ujung medula spinalis rusak, menjalar ke serabut kortikospinal dan radikl dorsalis lumbosakral disertai disfungsi *upper motor neuron* (UMN) dan *lower motor neuron* (LMN).
- e. Sindrom kauda equina. Sindrom ini disebabkan akibat dislokasi tulang atau ekstrusi diskus pada regio lumbal dan sakral, dengan radikl dorsalis kompresi lumbosakral dibawah konus medularis. Pada umumnya terdapat disfungsi BAB dan BAK, parestesi, dan paralisis.



Gambar 2.6 Lokasi lesi pada sindroma-sindroma akibat lesi inkomplit cedera korda spinalis (Fehling *et al.*, 2012)

2.1.6 Tatalaksana

Tatalaksana pasti cedera korda spinalis sampai saat ini masih menjadi sebuah perdebatan, banyak perubahan yang terjadi setiap tahunnya, meskipun begitu dekompresi, reduksi dan stabilisasi tetap menjadi penatalaksanaan utama pada penderita penderita SCI sementara terapi farmakologis sebagai tambahan diharapkan dapat membantu memperbaiki hasil akhir kondisi pasien dengan cedera korda spinalis (Wang *et al.*, 2017).

Sejumlah obat farmakologis telah dikembangkan dengan tujuan menekan proses cedera sekunder pada SCI, namun sampai saat ini hanya methylprednisolone sodium suksinat (MPSS) yang telah terbukti bermanfaat secara klinis. Agen lain seperti tirilazad mesylate, GM 1 ganglioside, *tirotropin*

releasing hormone (TRH), gacyclidine, naloxone dan nimodipine belum terbukti dan masih diteliti lebih lanjut (Wang *et al.*, 2017).

Inflamasi yang terjadi pascatrauma dapat mengakibatkan apoptosis pada neuron, oligodendrosit dan juga pembentukan jaringan parut sehingga memperberat degenerasi fungsi neuronal (Kolomin *et al.*, 2013). Pemberian MPSS dapat menekan inflamasi dengan cara menekan pembentukan sitokin inflamasi oleh sel sel yang dapat memproduksi TNF, sehingga rangkaian proses cedera sekunder lainnya seperti *excitotoxicity* dan *free radical* dapat terputus (Fehling *et al.*, 2012).

2.1.7 Komplikasi

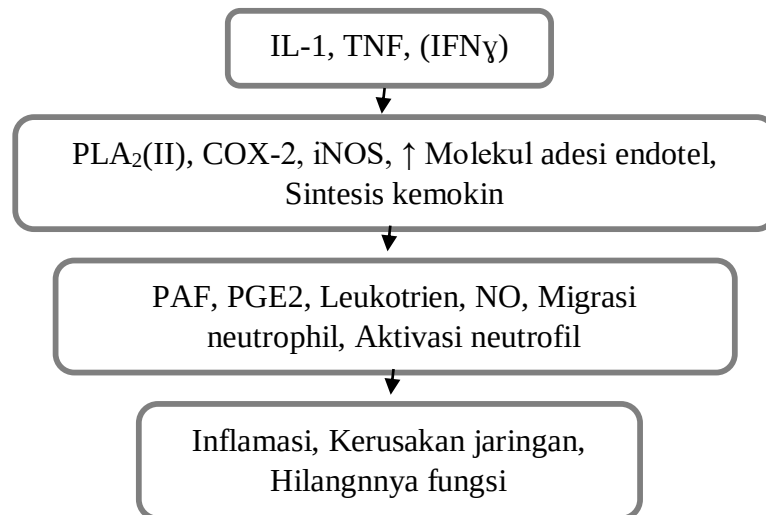
Penyebab utama kematian setelah cedera medula spinalis dapat dicegah. Cara terbaik mencegah terjadinya gagal ginjal disertai infeksi saluran kencing berulang adalah dengan melakukan kateterisasi *bladder* intermiten secara hati-hati. Ulkus dekubitus mudah terbentuk pada tulang yang menonjol pada area yang teranestesi, hal tersebut dapat dicegah dengan dengan cara *turning of patients* dan memutar tempat tidur. Penderita dengan defisit motorik disertai cedera medula spinalis memiliki resiko tinggi trombosis vena dalam. Penderita sebaiknya mendapatkan *low-molecular-weight heparin*, *pneumatic compression stockings* atau keduanya sebagai profilaksis.

2.2 Inflamasi

Respon imun pada manusia diatur oleh suatu mekanisme yang sangat kompleks. Salah satu mekanisme yang menonjol adalah respon inflamasi. Inflamasi merupakan respon tubuh yang dipicu oleh adanya kerusakan jaringan

tubuh. Inflamasi merupakan suatu mekanisme pertahanan tubuh terhadap suatu stimulus dari luar. Tujuannya adalah membuang agen yang menyebabkan cedera dan untuk membuang sel sel yang rusak sehingga proses penyembuhan dapat terjadi. (Glutton, 2017)

Sitokin adalah protein yang berfungsi untuk meregulasi respon tubuh terhadap infeksi, inflamasi dan trauma. Beberapa sitokin bekerja untuk merangsang timbulnya inflamasi (pro inflamasi) sedangkan beberapa lainnya bekerja untuk menekan timbulnya inflamasi (anti inflamasi), berikut ini meruakan proses inflamasi yang di aktifasi melalui sitokin inflamasi.(Opal *et al.*, 2012)



Gambar 2.7 Proses reaksi inflamasi akibat sitokin-sitokin pro-inflamasi (Zhang *et al.*, 2012)

Dalam keadaan fisiologis respon inflamasi di regulasi oleh sitokin pro inflamasi maupun anti inflamasi, karena pada beberapa keadaan respon inflamasi perlu dibatasi untuk mencengah kerusakan sel yang berlebihan. Ada berbagai sitokin anti inflamasi untuk meregulasi poses inflamasi, efek anti inflamasi yang di timbulkan merupakan hasil akhir dari keseluruhan sitokin anti inflamasi

tersebut. Berikut ini merupakan beberapa sitokin anti inflamasi (Dinarello *et al.*, 2000).

Tabel 2.2 Sitokin anti inflamasi (Glutton, 2017)

Sitokin	Sel sumber	Aktivitas utama
<i>IL-1ra</i>	Monosit/ sel dendritik makrofak	Inhibitor spesifik <i>IL-1α</i> dan <i>IL-1β</i> pada level reseptor selular <i>IL-1</i>
<i>IL-4</i>	Sel T (Th2), sel mast, sel B, sel stroma	Memacu perkembangan leukosit Th2: menghambat sintesis sitokin proinflamasi oleh LPS
<i>IL-6</i>	Sel T, Sel B, monosit, PMN	Menghambat produksi <i>TNF</i> dan <i>IL-1</i> oleh makrofag
<i>IL-10</i>	Monosit/makrofag, sel T (Th2), sel B	Menghambat produksi sitokin oleh monosit/ makrofag dan neutrophil serta menghambat respon limfosit (<i>Th1</i>)
<i>IL-11</i>	sel stroma, fibroblast	Menghambat respon sitokin proinflamasi oleh monosit/ makrofag dan meningkatkan respon limfosit Th2
<i>IL-13</i>	Sel T (Th2)	Homolog dengan <i>IL-4</i> dan dapat berinteraksi dengan reseptor <i>IL-4</i>
<i>TGF-β</i>	Diproduksi di banyak sel	Inhibisi monosit/makrofag melalui ekspresi MHC kelas II dan sintesis sitokin proinflamasi.

Secara garis besar aktivitas sitokin anti inflamasi adalah untuk memblokir proses inflamasi yang dipicu sitokin pro inflamasi atau menekan produksi sitokin proinflamasi. Contohnya seperti *IL-4*, *IL-10*, *IL-13* dan *TGF-B* berperan dengan menekan produksi *IL-1*, *IL-8* dan *TNF* sehingga hasil akhir respon inflamasi dapat ditekan. Pada beberapa percobaan dengan menghapus gen penghasil *IL-10* pada tikus, dapat memicu timbulnya penyakit peradangan usus. (Glutton, 2017)

2.3 $ACTH_{4-10}Pro^8-Gly^9-Pro^{10}$

$ACTH_{4-10}Pro^8-Gly^9-Pro^{10}$ adalah heptapeptid dan analog sintetik dari fragmen hormon adrenokortikotropik (ACTH) dengan penggantian tiga asam amino C terminal dengan urutan pro-gly-pro (Medvedeva *et al.*, 2014).

Hormon ACTH dan fragmennya merupakan peptida regulasi endogen yang paling banyak dipelajari. ACTH adalah polipeptida rantai tunggal yang terdiri dari 39 asam amino yang terbentuk di lobus glandular lobus anterior dari hipofisis melalui pemrosesan *post translasional* protein proopiomelanokortin prekursor (POMC) (Kolomin *et al.*, 2013).

Mekanisme kerja utama ACTH berhubungan dengan steroidogenesis. Setelah berikatan dengan reseptor melanokortin 2 (MC2) pada membran plasma sel kortikal kelenjar suprarenal, kortikotropin meningkatkan sintesis glukokortikoid (Kolomin *et al.*, 2013).

Penemuan efek nootropik, neuroprotektor dan neurotrofik membuat peptida ini menjadi salah satu kandidat obat yang berguna untuk pencegahan dan penanganan jalur sistem syaraf pusat yang paling menjanjikan, namun penerapannya secara klinis nampak sulit terutama karena alasan stabilitas dan efek jangka panjang dari peptida ini, oleh karena itu banyak diproduksi analog sintesis yang lebih tahan terhadap aksi protease dan berkali kali lebih aktif (Kolomin *et al.*, 2013).

Pada akhir 1970-an, sebuah tim peneliti dipimpin oleh Drs N.F. Myasoedov dan I.P. Ashmarin memprakarsai penelitian untuk membuat sediaan peptida dengan dasar ACTH dan fragmennya. Kekurangan ACTH alami adalah

keterbatasan penerapannya, karena waktu kerjanya yang pendek (sekitar 30-60 menit) (Kolomin *et al.*, 2013).

Analog ACTH dengan penggantian tiga asam amino C-terminal dengan urutan Pro-Gly-Pro menunjukkan aktifitas nootropik jangka panjang. Peptida ini yang disebut Semax, menunjukkan efek nootropik dari prototipe alami, namun pengaruh berlangsung 20-25 jam (Kolomin *et al.*, 2013).

2.3.1 Neuroprotektif

$ACTH_{4-10}Pro^8-Gly^9-Pro^{10}$ memiliki sifat neuroprotektif, yaitu mengurangi jumlah sel yang rusak karena oksidatif stress yang disebabkan oleh inkubasi jangka pendek dengan H_2O_2 dan meningkatkan kelangsungan hidup neuron granula pada serebelum selama neurotoksisitas glutamat, yang mungkin disebabkan oleh efeknya pada homeostasis kalsium dan fungsi mitokondria (Kolomin *et al.*, 2013).

Setelah hipoksia hipobarik akut pada tikus dengan usia berbeda, menunjukkan bahwa pretreatmen $ACTH_{4-10}$ tunggal (50 $\mu g/kg$) menyebabkan peningkatan ketahanan individu hewan terhadap hipoksia dan mengurangi perubahan perilaku yang disebabkan oleh kekurangan oksigen (Kolomin *et al.*, 2013).

2.3.2 Neurotropik

Efek neurotropik $ACTH_{4-10}$ dikaitkan dengan pengaruhnya terhadap ekspresi neurotropin. Pada kultur sel glia, dihasilkan reaksi cepat induksi transkripsi gen neurotropin *Bdnf* dan *Ngf*. Pada hippocampus yang tidak sehat, $ACTH_{4-10}$ meningkatkan penekanan gen neurotropin pada tingkat protein (*Bdnf* dan *TrkB*) (Kolomin *et al.*, 2013). Semax dan fragmen C-terminalnya Pro-Gly-Pro

mengaktifkan jaringan kapiler dan meningkatkan proliferasi glia, endotelium pembuluh darah dan sel progenitor di zona subventricular pada hewan sehat (Kolomin *et al.*, 2013).

2.3.3 *ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰* pada cedera korda spinalis

Penelitian terkait efek *ACTH4-10* pada cedera korda spinalis akut belum banyak dilakukan. Beberapa penelitian yang sudah dilakukan salah satunya oleh dr. Muhammad Faris terkait hubungan pemberian *ACTH4-10* terhadap respon inflamasi pada cedera korda spinalis (Faris, 2020). Penelitian ini terinspirasi oleh penelitian sebelumnya oleh Sim *et al.* yang mengamati adanya perbaikan motorik pada tikus dengan pemberian *ACTH4-10* (Sim *et al.*, 2017).

Sebuah penelitian sebelumnya telah membahas bahwa terdapat hubungan *ACTH4-10* terhadap ekspresi mediator-mediator pro-inflamasi (*TLR-2*, *NF-kB*, *IL-8*, *TNF- α* dan *neutrophil*) pada hewan coba tikus Sprague dawley diketahui bahwa pada kelompok perlakuan ditemukan ekspresi mediator-mediaor pro-inflamasi menurun secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini diduga disebabkan oleh ikatan *ACTH4-10* dengan reseptor melanokortin yang kemudian menghasilkan kortisol dan menekan mediator-mediator pro-inflamasi (Faris *et al.*, 2020).

Penelitian lainnya juga mengungkapkan terdapat hubungan antara pemberian *ACTH4-10* pada cedera korda spinalis akut pada hewan coba tikus sprague dawley dengan penurunan jumlah apoptosis sel melalui peningkatan rasio *Bcl-2/HSP70* (Subagio, 2018).

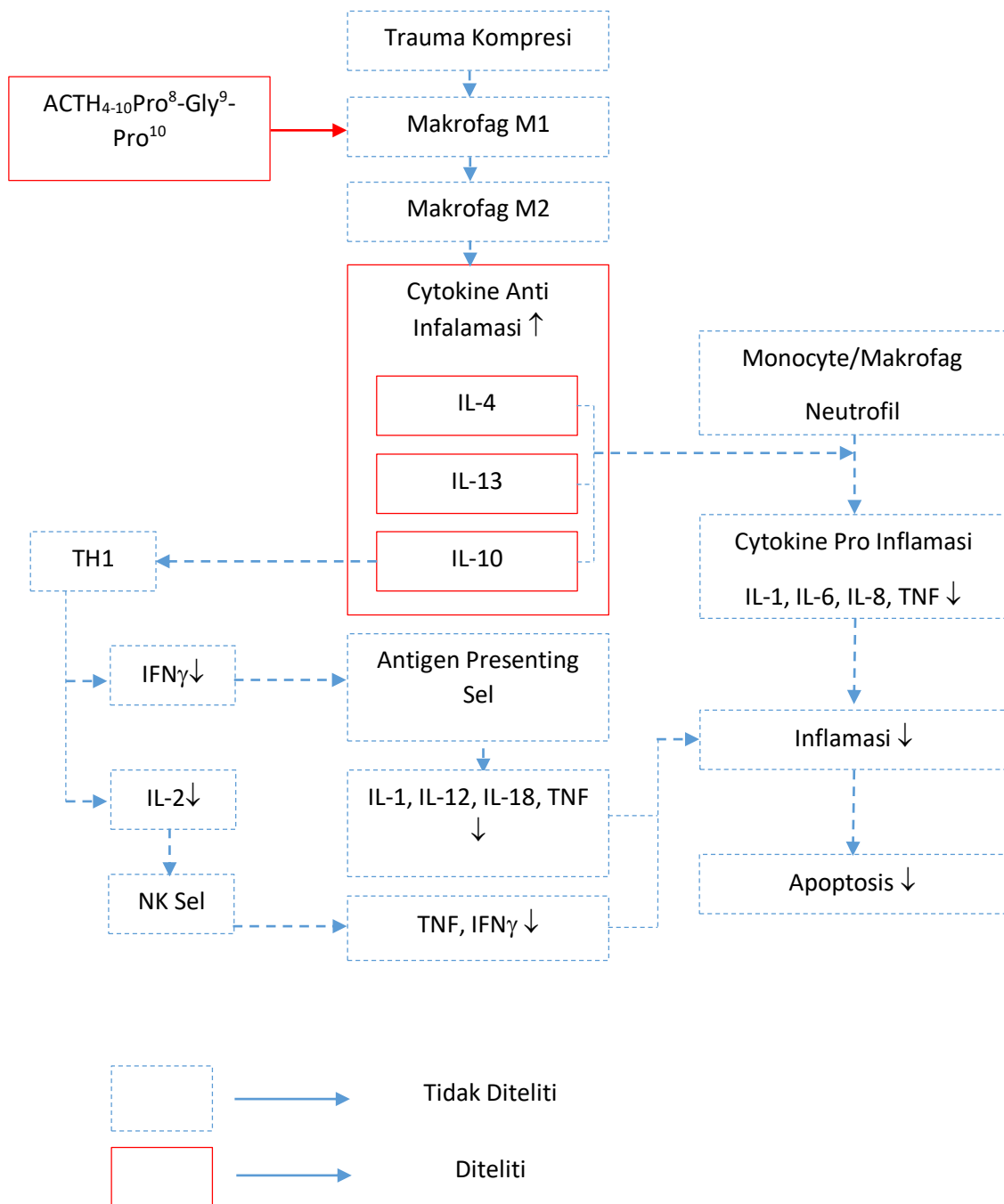
2.4 Model *SCI* pada Hewan Coba (Tikus *Sprague dawley*)

Secara umum, model cedera kompresi dapat dikerjakan lebih mudah dengan varians interoperator lebih sedikit daripada model penjatuhan beban dari Allen. Model cedera kompresi klip ekstradural sesuai dengan kombinasi dari dampak akut dan kompresi yang bertahan lama, menyerupai karakteristik kebanyakan *SCI* pada manusia. Model ini diperkenalkan pada tahun 1978 dan merupakan salah satu dari model nontranseksi pertama yang dikerjakan pada spesies tikus. Saat klip dilepaskan, kontusio mielum dihasilkan oleh kompresi yang memberi efek untuk aspek dorsal maupun ventral dari mielum. Pada studi sebelumnya dilakukan pengamatan lokomotor setelah minggu ke 4 dengan tes Basso, Beattie dan Bresnahan serta pemeriksaan histologis untuk melihat ukuran kavitas yang muncul pada mielum, didapatkan kesimpulan bahwa kompresi dengan 20g selama 1 menit setara dengan cedera kompresi ringan dan kompresi 35g selama 1 menit setara dengan cedera kompresi berat (Poon *et al.*, 2007). Model kompresi dikatakan juga merupakan metode yang tepat untuk mempelajari mekanisme dari cedera sekunder serta untuk studi translasional (Ahmed *et al.*, 2019).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka konseptual

Penjelasan Kerangka Konseptual:

Cedera sekunder pada korda spinalis akan menyebabkan berbagai macam kaskade yang berujung pada terjadinya apoptosis, salah satunya adalah inflamasi yang di picu terutama oleh sitokin pro-inflamasi yang dihasilkan makrofag M1. *ACTH4-10* merupakan golongan neuroprotektor yang bekerja dengan cara berikatan pada reseptor melanokortin dan dapat mengkonversi makrofag M1 menjadi M2 sehingga memberikan efek anti inflamasi.

Proses inflamasi diatur melalui dua jalur yaitu sitokin pro-inflamator dan sitokin anti-inflamator. Pemberian *ACTH4-10* diharapkan dapat menekan respon inflamasi melalui peningkatan sitokin anti inflamasi sehingga apoptosis dapat diturunkan.

Pada hewan coba model tikus diketahui bahwa inflamasi yang menyebabkan cedera korda spinalis terjadi pada jam pertama setelah trauma hingga mencapai puncak nya pada jam ke 6. Pengamatan kami lakukan pada jam ke 3 dan ke 6 untuk melihat pengaruh proses inflamasi yang terjadi seiring berjalannya waktu terhadap ekspresi sitokin anti inflamasi (*IL-4*, *IL-10*, dan *IL-13*) paska pemberian *ACTH4-10* pada hewan coba model kompresi korda spinalis akut.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian *ACTH4-10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi ringan mielum dapat meningkatkan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, dan *IL-13* pada jam ke 3.

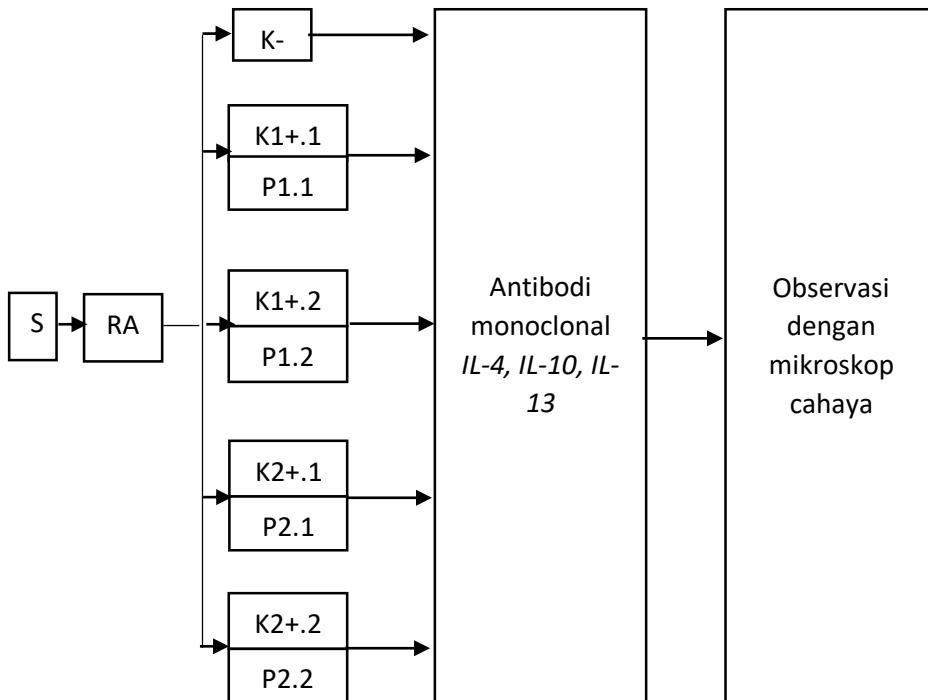
2. Pemberian *ACTH4-10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi ringan mielum dapat meningkatkan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, dan *IL-13* pada jam ke 6.
3. Pemberian *ACTH4-10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi berat mielum dapat meningkatkan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, dan *IL-13* pada jam ke 3.
4. Pemberian *ACTH4-10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi berat mielum dapat meningkatkan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, dan *IL-13* pada jam ke 6.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian *true experimental* laboratoris dengan rancangan acak lengkap (*completely randomized design*) pola faktorial. Subjek penelitian dibagi dalam 9 kelompok. Secara skematis rancangan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 4.1 Rancangan penelitian

Keterangan:

S : Subyek penelitian / unit eksperimen

RA : Randomisasi Alokasi

- K- : Kelompok kontrol negatif. Tikus *Sprague-Dawley* yang dilakukan laminektomi pada level vertebra thorakal 2 tanpa perlakuan kompresi ringan maupun berat, lalu kulit ditutup dengan cara dijahit.
- K1+.1: Kelompok kontrol positif 1.1. Tikus *Sprague-Dawley* yang dilakukan laminektomi pada level vertebra thorakal 2, kemudian dilakukan kompresi extradural menggunakan alat klip aneurisma yang sudah dimodifikasi sedemikian hingga mempunyai kekuatan jepitan 20 g. Kompresi dilakukan selama 1 menit. Tempat laminektomi dijahit kembali. Diberikan tetes hidung PZ, kemudian dikorbankan dan dilakukan transeksi medula spinalis pada jam ke-3.
- P1.1 : Kelompok perlakuan 1.1. Tikus *Sprague-Dawley* yang dilakukan laminektomi pada level vertebra thorakal 2, kemudian dilakukan kompresi extradural menggunakan alat klip aneurisma yang sudah dimodifikasi sedemikian hingga mempunyai kekuatan jepitan 20 g. Kompresi dilakukan selama 1 menit. Tempat laminektomi dijahit kembali. Diberikan tetes hidung *ACTH 4-10* dengan dosis 300 µg/kg, kemudian dikorbankan dan dilakukan transeksi medula spinalis pada jam ke-3.
- K1+.2: Kelompok kontrol positif 1.2. Tikus *Sprague-Dawley* yang dilakukan laminektomi pada level vertebra thorakal 2, kemudian dilakukan kompresi extradural menggunakan alat klip aneurisma yang sudah dimodifikasi sedemikian hingga mempunyai kekuatan jepitan 20 g. Kompresi dilakukan selama 1 menit. Tempat laminektomi dijahit kembali. Diberikan tetes hidung PZ, kemudian dikorbankan dan dilakukan transeksi medula spinalis pada jam ke-6.

P1.2 : Kelompok perlakuan 1.2. Tikus *Sprague-Dawley* yang dilakukan laminektomi pada level vertebra thorakal 2, kemudian dilakukan kompresi extradural menggunakan alat klip aneurisma yang sudah dimodifikasi sedemikian hingga mempunyai kekuatan jepitan 20 g. Kompresi dilakukan selama 1 menit. Tempat laminektomi dijahit kembali. Diberikan tetes hidung *ACTH 4-10* dengan dosis 300 µg/kg, kemudian dikorbankan dan dilakukan transeksi medula spinalis pada jam ke-6.

K2+.1: Kelompok kontrol positif 2.1. Tikus *Sprague-Dawley* yang dilakukan laminektomi pada level vertebra thorakal 2, kemudian dilakukan kompresi extradural menggunakan alat klip aneurisma yang sudah dimodifikasi sedemikian hingga mempunyai kekuatan jepitan 35 g. Kompresi dilakukan selama 1 menit. Tempat laminektomi dijahit kembali. Diberikan tetes hidung PZ, kemudian dikorbankan dan dilakukan transeksi medula spinalis pada jam ke-3.

P2.1 : Kelompok perlakuan 2.1. Tikus *Sprague-Dawley* yang dilakukan laminektomi pada level vertebra thorakal 2, kemudian dilakukan kompresi extradural menggunakan alat klip aneurisma yang sudah dimodifikasi sedemikian hingga mempunyai kekuatan jepitan 35 g. Kompresi dilakukan selama 1 menit. Tempat laminektomi dijahit kembali. Diberikan tetes hidung *ACTH 4-10* dengan dosis 300 µg/kg, kemudian dikorbankan dan dilakukan transeksi medula spinalis pada jam ke-3.

K2+.2 : Kelompok kontrol positif 2.2. Tikus *Sprague-Dawley* yang dilakukan laminektomi pada level vertebra thorakal 2, kemudian dilakukan kompresi extradural menggunakan alat klip aneurisma yang sudah dimodifikasi

sedemikian hingga mempunyai kekuatan jepitan 35 g. Kompresi dilakukan selama 1 menit. Tempat laminektomi dijahit kembali. Diberikan tetes hidung PZ, kemudian dikorbankan dan dilakukan transeksi medula spinalis pada jam ke-6.

P2.2 : Kelompok perlakuan 2.2+. Tikus *Sprague-Dawley* yang dilakukan laminektomi pada level vertebra thorakal 2, kemudian dilakukan kompresi extradural menggunakan alat klip aneurisma yang sudah dimodifikasi sedemikian hingga mempunyai kekuatan jepitan 35 g. Kompresi dilakukan selama 1 menit. Tempat laminektomi dijahit kembali. Diberikan tetes hidung *ACTH 4-10* dengan dosis 300 µg/kg, kemudian dikorbankan dan dilakukan transeksi medula spinalis pada jam ke-6.

4.2 Unit Eksperimen dan Replikasi

4.2.1 Unit eksperimen

Unit Eksperimen adalah sel neuron pada korda spinalis yang berasal dari hewan coba tikus *Sprague Dawley* jantan berumur 2 – 3 bulan pada level vertebra Th2. Secara fisik dalam kondisi sehat, berat 250 sampai 300 g. Kesehatan hewan coba dapat diamati dari gerakan cukup lincah, tidak lesu, kulit bersih dan tanpa luka, mata terang dan tidak sayu. Sampel diperoleh dari unit percobaan Institut Teknologi Bandung.

4.2.2 Replikasi

Jumlah blok parafin untuk masing – masing kelompok ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(9-1)(r-1) \geq 15$$

$$(8)(r-1) \geq 15$$

$$r \geq 23/8$$

$$r \geq 2,875$$

Dimana:

t : jumlah kelompok perlakuan

r : jumlah replikasi

Berdasarkan rumus diatas jumlah replikasi setiap kelompok adalah lebih dari atau sama dengan 2,875. Pada penelitian ini jumlah sampel tiap kelompok adalah 3, sehingga jumlah sampel keseluruhan adalah $3 \times 9 = 27$ blok.

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

4.3.1 Variabel penelitian

Variabel bebas:

Kelompok paparan intervensi yang diberikan *ACTH 4-10*.

Variabel tergantung:

- a. Ekspresi *IL-4*
- b. Ekspresi *IL-10*
- c. Ekspresi *IL-13*

4.3.2 Definisi operasional variabel penelitian

Tabel 4.1 Definisi operasional variable penelitian

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala data
1.	<i>ACTH4-10Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰</i>	Sebuah analog sintetis fragmen pendek <i>ACTH</i> yang tidak memiliki aktivitas hormonal yang terkait dengan molekul <i>ACTH</i> lengkap, namun memiliki efek neuroproteksi. <i>ACTH4-10Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰</i> diberikan secara intra nasal, dengan dosis 300 µg/kg BB. Tersedia dalam sediaan 3mg/3mL (0.1%), di keluarkan oleh PT Axomedika dengan nama dagang SEMAX. Pemberian <i>ACTH4-10Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰</i> pada 1 jam setelah perlakuan kompresi mielum.	visual	jumlah blok parafin	Rasio
2.	Ekspresi <i>IL-4</i>	<i>Sitokin</i> anti inflamasi yang sebagian besar diproduksi oleh sel mast, <i>IL-4</i> berperan dalam menekan sitokin pro inflamasi.	Imunohistokima dengan <i>antibody monoclonal IL-4</i>	Jumlah sel/lapang pandang dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x.	Rasio
3	Ekspresi <i>IL-10</i>	<i>Sitokin</i> anti inflamasi yang sebagian besar diproduksi oleh monosit, <i>IL-10</i> berperan dalam menekan sitokin pro inflamasi.	Imunohistokima dengan <i>antibody monoclonal IL-10</i>	Jumlah sel/lapang pandang dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x.	Rasio
4	Ekspresi <i>IL-13</i>	<i>Sitokin</i> anti inflamasi yang sebagian besar diproduksi oleh <i>Th2</i> , <i>IL-13</i> berperan dalam menekan sitokin pro inflamasi.	Imunohistokima dengan <i>antibody monoclonal IL-13</i>	Jumlah sel/lapang pandang dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x.	Rasio

4.4 Materi Penelitian

1. Blok paraffin dari sediaan penelitian sebelumnya oleh subagio, 2014 dengan panjang sekitar 1 cm dan kemudian dilakukan irisan tipis dengan ketebalan 4 mikrometer.
2. Antibodi kit untuk ekspresi *IL-4*, *IL-10* dan *IL-13*, mikroskop.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.5.1 Lokasi penelitian

Penelitian ini memakai sediaan blok paraffin yang sudah dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga pada penelitian sebelumnya. Pembuatan parafin blok,

pemotongan dan pembuatan preparat, dilakukan di bagian Patologi Anatomi Universitas Brawijaya. Pengecatan imunohistokimia dan pembacaan dikerjakan di bagian Biokimia Universitas Brawijaya.

4.5.2 Waktu penelitian

Penelitian ini oleh peneliti dilaksanakan pada bulan Maret 2018 - April 2019.

4.6 Pelaksanaan Penelitian

Persiapan penelitian poin 4.6.1 hingga poin 4.6.5 telah dikerjakan dalam penelitian sebelumnya oleh Subagio sebagai disertasi program doktoralnya.

4.6.1 ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰

Tersedia sediaan 3mg/3mL (0.1%), di keluarkan oleh PT Axomedika dengan nama dagang SEMAX. Dosis per tikus adalah 300 µg/kg BB. Tikus Sprague-Dawley jantan, sehat dengan berat badan 300 g, memerlukan:

$$(300: 1.000) \times 300 \mu\text{g} = 90 \mu\text{g}$$

atau sama dengan:

$$(90: 1.000) \text{ mL} = 0,09 \text{ mL} = 90 \mu\text{l}$$

4.6.2 Pembuatan Hewan Model

Pada penelitian sebelumnya dipergunakan 27 tikus, secara fisik dipilih yang sehat, berat badan 250 g sampai dengan 300 g. Tikus diambil secara acak, artinya pengelompokan anggota-anggota kelompok kontrol dan eksperimen dilakukan berdasarkan acak atau random. Kelompok-kelompok tersebut dianggap sama sebelum perlakuan lalu dibagi secara acak untuk kelompok kontrol dan perlakuan.

4.6.3 Aklimatisasi Hewan Coba

Aklimatisasi hewan coba tikus putih jantan galur *Sprague dawley* yang berusia 12 minggu dengan berat antara 250-300 g selama satu pekan untuk adaptasi di tempat pemeliharaan. Makanan tikus yang diberikan berupa pelet. Pemberian makanan dan minuman kepada binatang percobaan dilakukan secara *ad libitum*, suhu kandang dijaga sekitar 25°C dan ada pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam. Masing-masing kelompok tikus diletakkan dalam kandang tersendiri dan dijaga sedemikian rupa sehingga tidak saling berinteraksi.

4.6.4 Prosedur Pembiusan

Penelitian dilakukan tikus jantan dewasa *Sprague dawley*. Anestesi dilakukan dengan pemberian ketamin yang dikombinasikan dengan xylazine (IACUC, 2018). Ketamin diinjeksikan intraperitoneal dengan menggunakan spuit 10 cc yang mengandung 10 cc ketamine (100 mg/mL) dan 1 cc xylazine (100 mg/mL). Campuran obat tersebut disuntikan sebanyak 0.1 cc/100gram berat badan tikus. Campuran obat tersebut mengandung 91 mg/kg ketamin dan 9.1 mg/kg xylazine (IACUC, 2018). Hilangnya refleks karpopedal merupakan indikator agen anestesi tersebut sudah terhantarkan dengan baik sehingga operasi dapat segera dimulai dengan lamanya agen anestesi tersebut selama 60-80 menit (IACUC, 2018). Setelah injeksi dilakukan monitoring terhadap fungsi hemodinamik secara klinis meliputi mukus membran harus berwarna merah muda dan lembab, *capillary refill time* harus kurang dari 2 detik (IACUC, 2018).

4.6.5 Alat Kompresi

Alat kompresi menggunakan klip aneurisma yang sudah dimodifikasi dengan menipiskan bilah klip aneurisma kemudian dilakukan pengukuran hingga

mempunyai kekuatan jepitan seberat 20 g dan 35 g. Klip aneurisma dipasang pada mielum setelah dilakukan laminektomi dan ekspose dura. Kompresi dilakukan selama 1 menit pada segmen Th2, kemudian dilepaskan dan ditutup kembali dengan cara dijahit. Pada studi sebelumnya telah dilakukan pengamatan lokomotor pada tikus setelah minggu ke 4 dengan tes Basso, Beattie dan Bresnahan serta pemeriksaan histologis untuk melihat ukuran kavitas yang muncul pada mielum, didapatkan kesimpulan bahwa kompresi dengan 20g selama 1 menit setara dengan cedera kompresi ringan dan kompresi 35g selama 1 menit setara dengan cedera kompresi berat (Poon et al., 2007)

4.6.6 Pembuatan Blok Parafin Jaringan

Pembuatan blok parafin telah dikerjakan dalam penelitian sebelumnya dengan cara jaringan mielum dicuci dengan PBS 3-5 x untuk membersihkan dari kontaminan, lalu difiksasi pada formalin 10%. Kemudian dilakukan dehidrasi memakai *etanol* bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut) masing-masing 60 menit. Kemudian tahapan *Clearing* menggunakan *xylol* 2 kali masing-masing 60 menit. Kemudian infiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C. Kemudian dibuat blok dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari. Keesokan harinya di potong setebal 4-6µm menggunakan *rotary microtome*. Dilakukan *mounting* pada gelas objek dengan gelatin 5%.

4.6.7 Metode Deparafinisasi

Gelas obyek hasil blok parafin direndam dalam *xylol* 2 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah itu dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol berseri

(absolut, 96%, 80%, 70%, 50% dan 30%) masing-masing selama 5 menit. Kemudian dibilas dalam dH₂O selama 5 menit.

4.6.8 Penghitugan ekspresi *IL-4*

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Proses blocking menggunakan H₂O₂ 3% selama 20 menit. Pencucian menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Proses blocking unspesifik protein memakai FBS 5% dan 0,25% Triton X-100. Pencucian dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi menggunakan *rabbit poliklonal* anti *IL-4*, selama 60 menit. Pencucian dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Ditetesi *Diamino Benzidine* (DAB) lalu diinkubasi selama 10 menit. Pencucian dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. *Counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxilen* yang diinkubasi selama 10 menit, lalu dicuci menggunakan tap water, dibilas dengan dH₂O dan kering anginkan. Diamati pada mikroskop cahaya.

4.6.9 Penghitugan ekspresi *IL-10*

Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Proses blocking menggunakan H₂O₂ 3% selama 20 menit. Pencucian menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Proses blocking unspesifik protein memakai FBS 5% dan 0,25% Triton X-100. Pencucian dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi menggunakan *rabbit poliklonal* anti *IL-10*, selama 60 menit. Pencucian dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Ditetesi *Diamino Benzidine* (DAB) lalu diinkubasi selama 10 menit. Pencucian dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali,

masing-masing selama 5 menit. *Counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxilen* yang diinkubasi selama 10 menit, lalu dicuci menggunakan tap water, dibilas dengan dH₂O dan kering anginkan. Diamati pada mikroskop cahaya.

4.6.10 Penghitugan ekspresi *IL-13*

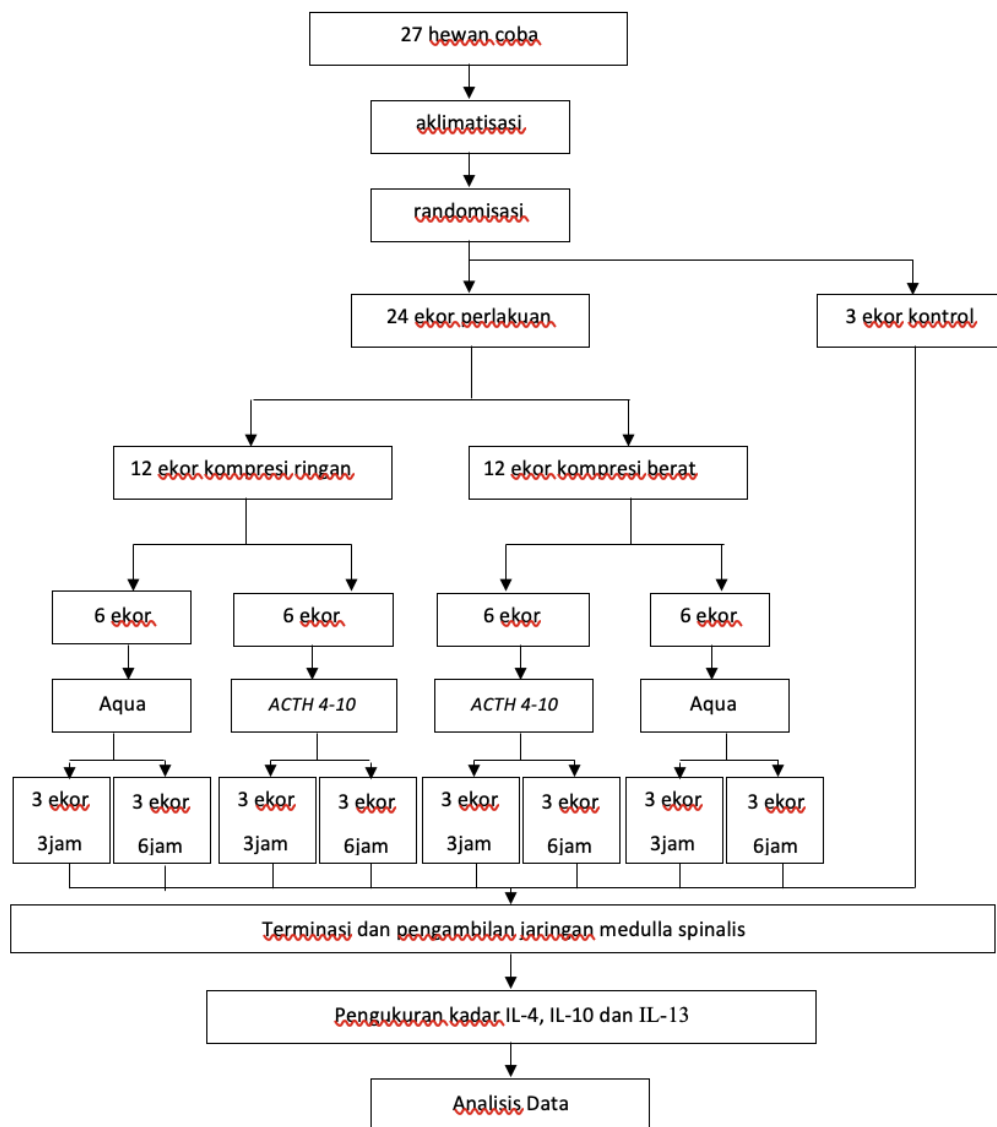
Slide dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Proses blocking menggunakan H₂O₂ 3% selama 20 menit. Pencucian menggunakan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Proses blocking unspesifik protein memakai FBS 5% dan 0,25% Triton X-100. Pencucian dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Inkubasi menggunakan *rabbit poliklonal* anti *IL-13*, selama 60 menit. Pencucian dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. Ditetesi *Diamino Benzidine* (DAB) lalu diinkubasi selama 10 menit. Pencucian dengan PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit. *Counterstaining* menggunakan *Mayer Hematoxilen* yang diinkubasi selama 10 menit, lalu dicuci menggunakan tap water, dibilas dengan dH₂O dan kering anginkan. Diamati pada mikroskop cahaya.

4.7 Cara Pengolahan dan Analisis Data

Pengumpulan data dilakukan dalam lingkungan yang terkontrol dan terkendali dengan asumsi semua kondisi diusahakan sama dan dapat dikendalikan. Data ekspresi *IL-4*, *IL-10* dan *IL-13* disajikan dalam bentuk grafik ekspresi relative. Normalitas data dilakukan dengan shapiro wilks dan data yang terkumpul dianalisis menggunakan uji analisis varian ANOVA pada distribusi data yang

normal. Pada distribusi data yang tidak normal, uji analisis menggunakan metode Kruskal-Wallis untuk mencari adanya perbedaan antar kelompok dilanjutkan dengan uji beda non parametrik menggunakan metode Mann-Whitney U test.

4.8 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.2 Kerangka operasional

BAB 5

HASIL DAN ANALISIS DATA PENELITIAN

5.1 Gambaran Umum Penelitian

Telah dilakukan penelitian pada blok paraffin yang berasal dari subyek tikus *Sprague-Dawley* jantan, berat 250 g sampai dengan 300 g. Tabel berat badan, dapat dipelajari pada Tabel 5.1 sebagai berikut.

Tabel 5.1 Hasil dan analisis data berat badan tikus

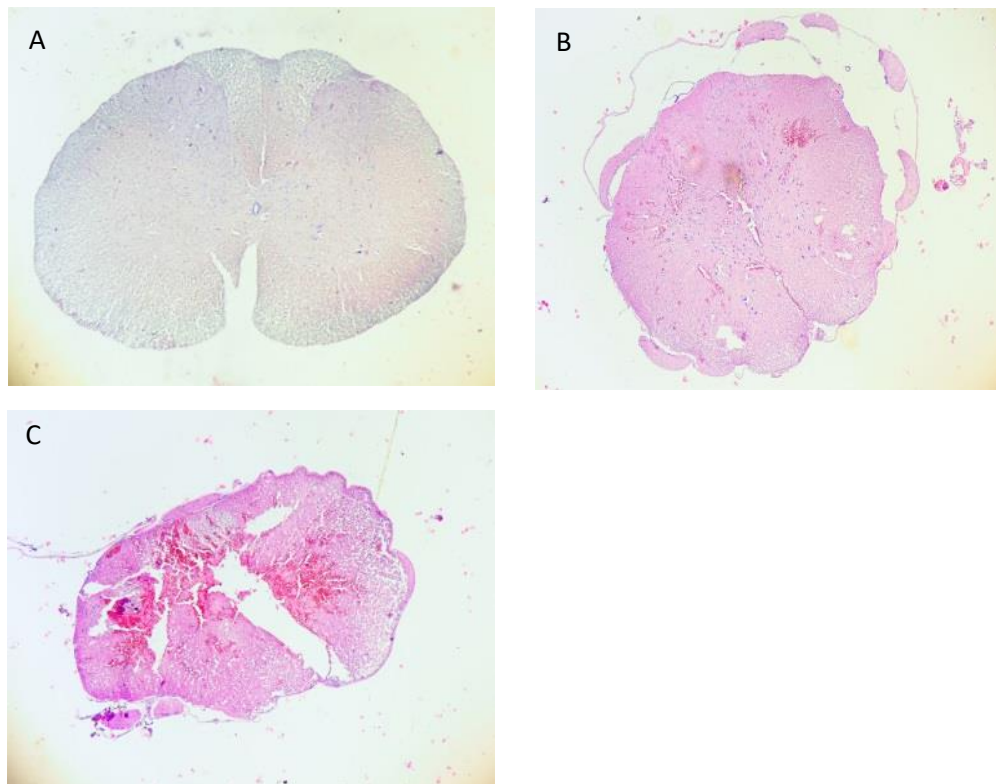
	Berat badan tikus (gram)	<i>p-value</i>
Rerata	280,045	
SD	$\pm 10,243$	0,245

Keterangan : Uji Homogenitas berat badan tikus *Sprague-Dawley* sebagai ASCI. Dengan uji *levane test*, tampak bahwa $p \geq 0.05$, sehingga dapat dinyatakan berat badan Tikus tidak berbeda secara signifikan.

Pada tikus ini sebelumnya telah dilakukan proses adaptasi dilakukan selama 14 hari pada laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Kemudian dilakukan randomisasi, pembagian kelompok menjadi sembilan kelompok, dengan masing-masing 3 tikus *Sprague Dawley*. Setiap kelompok dilakukan *laminectomy* pada sekitar *vertebra thoracal 2* dengan masing-masing mendapatkan satu kelompok sebagai kelompok kontrol negatif (K-).

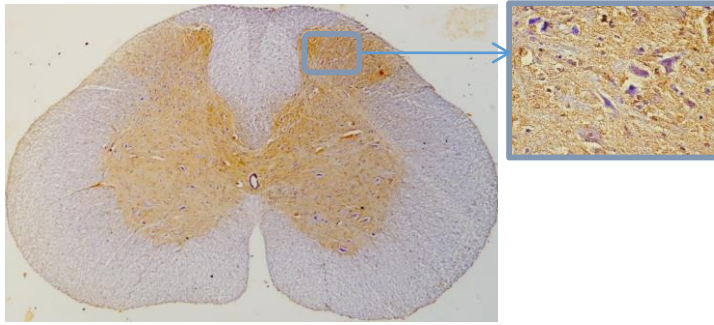
Kelompok kontrol positif (K⁺1.1 dan K⁺1.2) dengan pemberian trauma ringan dan pemberian tetesan NaCl 0,9% setelah satu jam. Kelompok kontrol positif ini dikorbankan setelah tiga (K⁺1.1) dan enam jam (K⁺1.2) pemberian trauma kompresi pada Korda Spinalis. Dua kelompok kontrol berikutnya (K⁺2.1 dan K⁺2.2) merupakan kelompok kontrol dengan pemberian trauma berat.

Kelompok perlakuan dengan pemberian trauma ringan (P1.1 dan P1.2) dan pemberian trauma berat (P2.1 dan P2.2), masing-masing diberikan tetesan *ACTH4-10* kemudian dikorbankan setelah tiga (P1.1 dan P2.1) dan enam jam (P1.2 dan P2.2) setelah pemberian trauma, Korda Spinalis di potong, difiksasi dengan formalin dan dilakukan pemeriksaan immunohistokimia untuk sitokin anti inflamasi (*IL-4*, *IL-10*, *IL-13*).



Gambar 5.1 Reperesentasi sediaan spinal tikus model ASCI yang dipulas menggunakan Hematoxilen Eosin. A. kelompok kontrol normal; B. kelompok ASCI ringan; C. ASCI berat

Penilaian ekspresi sitokin anti inflamasi (*IL-4*, *IL-10*, *IL-13*) dilakukan pada kornu posterior medula spinalis dengan teknik pemeriksaan imunohistokimia (IHC), dihitung per 100 sel menggunakan antibodi monoklonal terkait, dengan melihat adanya warna coklat pada sitoplasma sel, dilihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 1000x.

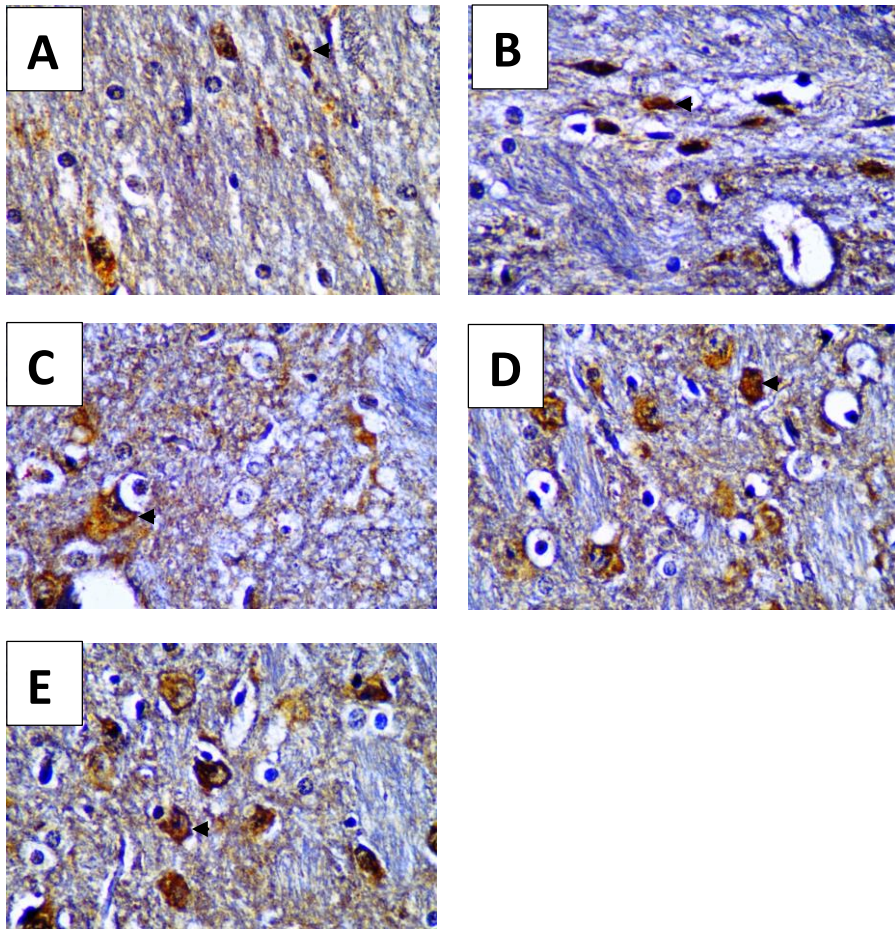


Gambar 5.2 Gambaran penampang melintang Korda Spinalis tempat pemeriksaan sel setelah pengecatan Immunohistokimia dan Tunnel

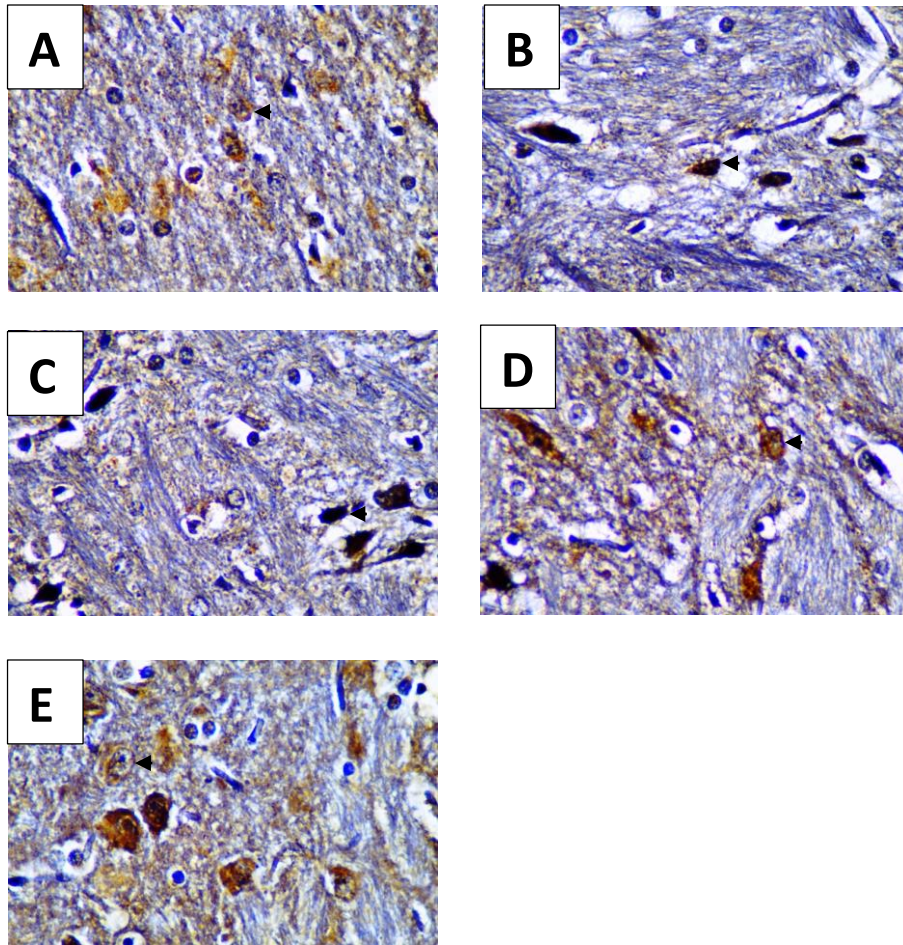
5.2 Ekspresi IL-4 pada Pewarnaan IHC Blok Parafin Hewan Model Cedera Kompresi Akut Medula Spinalis

Sebanyak tiga sampel dari masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan (*aquades* 3 dan 6 jam; *ACTH4-10Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰* 3 dan 6 jam) kompresi ringan dan berat diamati untuk ekspresi imunoreaktif terhadap pewarnaan sitokin *IL-4* untuk menilai reaksi anti-inflamasi *ACTH4-10* pada model cedera medula spinalis (*spinal cord injury* / SCI).

Pewarnaan jaringan medula spinalis hewan coba model cedera medula spinalis paska penjepitan klip aneurisma dilakukan menggunakan anti *IL-4*. Pengamatan pada mikroskop cahaya menghasilkan gambaran sel imunoreaktif yang mengekspresikan *IL-4* paska pemberian antibodi. Hasil pewarnaan medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI ringan disajikan dalam Gambar 5.1 dan pewarnaan medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI berat disajikan dalam Gambar 5.2.



Gambar 5.3 Hasil pengecatan *IHC IL-4* penampang melintang medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI ringan. Panah hitam menunjukkan neuron yang positif mengekspresi *IL-4*. A) Kelompok kontrol. B) Kelompok yang diberikan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 3 jam. C) Kelompok yang diberikan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 6 jam. D) Kelompok yang diberikan *ACTH(4-10)* dan dikorbankan setelah 3 jam. E) Kelompok yang diberikan *ACTH(4-10)* dan dikorbankan setelah 6 jam.

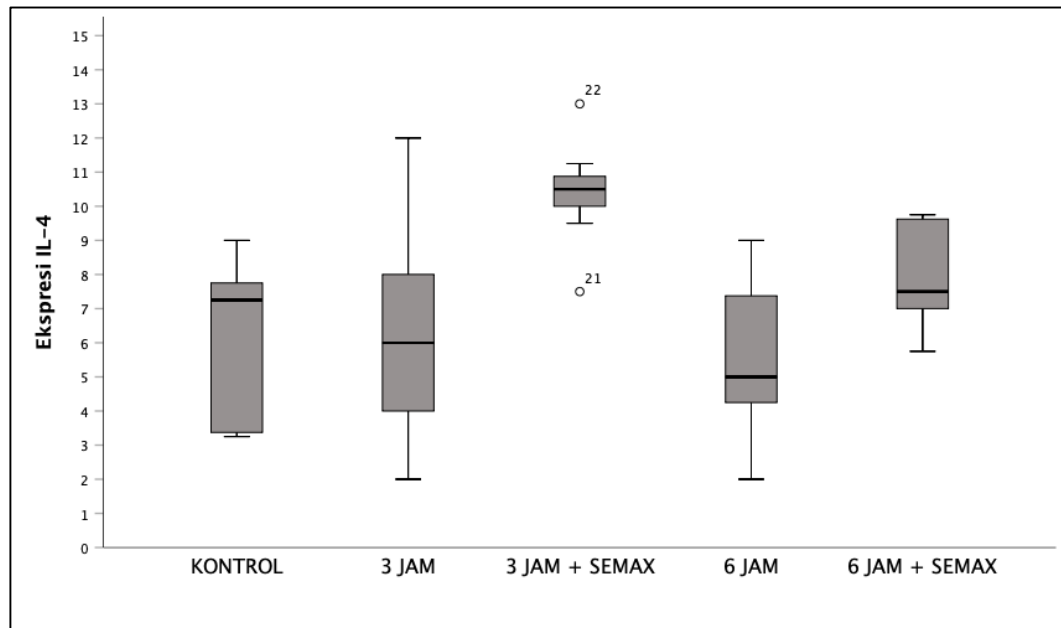


Gambar 5.4 Hasil pengecatan *IHC IL-4* penampang melintang medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI berat. Panah hitam menunjukkan neuron yang positif mengekspresi *IL-4*. A) Kelompok kontrol. B) Kelompok yang diberikan NaCl 0,9% dan dikorbkan setelah 3 jam. C) Kelompok yang diberikan NaCl 0,9% dan dikorbkan setelah 6 jam. D) Kelompok yang diberikan *ACTH(4-10)* dan dikorbkan setelah 3 jam. E) Kelompok yang diberikan *ACTH(4-10)* dan dikorbkan setelah 6 jam.

5.3 Hasil Uji Statistik Ekspresi *IL-4*

Analisis data tahap pertama dilakukan untuk menguji normalitas distribusi data, menggunakan uji Shapiro-Wilk. Hasil uji tiap kelompok pewarnaan IHC untuk ekspresi *IL-4* menunjukkan nilai $p > 0,05$ yang menandakan data memiliki distribusi yang normal. Analisis statistik dilakukan dengan metode ANOVA dan dilanjutkan oleh uji beda *Post Hoc* dengan metode Tukey.

5.3.1 Hasil ekspresi *IL-4* pada kelompok SCI ringan



Gambar 5.5 Hasil penilaian ekspresi *IL-4* pada SCI ringan

Pada kelompok *SCI* ringan yang ditetaskan NaCl 0,9% dan dikorbkan setelah 3 jam dan 6 jam didapatkan hasil ekspresi *IL-4* sebesar $6,29 \pm 3,4$ dan $5,61 \pm 2,45$. Sedangkan untuk kelompok *ASCI* ringan yang diberikan *ACTH4-10* dan dikorbkan setelah 3 jam dan 6 jam, didapatkan hasil ekspresi *IL-4* sebesar $10,39 \pm 1,67$ dan $8,04 \pm 1,62$.

Tabel 5.2 Hasil uji komparasi ANOVA ekspresi *IL-4* pada hewan coba model *SCI* ringan

Kelompok	Ekspresi <i>IL-4</i>		
	Rerata	Simpang baku	p
Kontrol	5,96	2,52	0,005
<i>ASCI</i> ringan NaCl 0,9% 3 jam	6,29	3,40	
<i>ASCI</i> ringan NaCl 0,9% 6 jam	5,61	2,45	
<i>ASCI</i> ringan <i>ACTH4-10</i> 3 jam	10,39	1,67	
<i>ASCI</i> ringan <i>ACTH4-10</i> 6 jam	8,05	1,62	

Tabel 5.2 menunjukkan hasil penilaian ekspresi *IL-4* pada hewan coba model *SCI* ringan masing-masing kelompok. Berdasarkan hasil ekspresi *IL-4* pada

masing-masing kelompok dapat dilihat bahwa kelompok dengan pemberian *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 dan 6 jam mempunyai nilai *rerata* yang lebih tinggi dari tanpa pemberian *ACTH4-10*. Didapatkan juga rerata ekspresi *IL-4* pada *ASCI* ringan yang diberikan *ACTH4-10* pada jam ke 3 lebih tinggi dibandingkan jam ke 6. Analisis statistik dilanjutkan dengan uji beda *Post Hoc* dengan metode Tukey HSD. Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel 5.3.

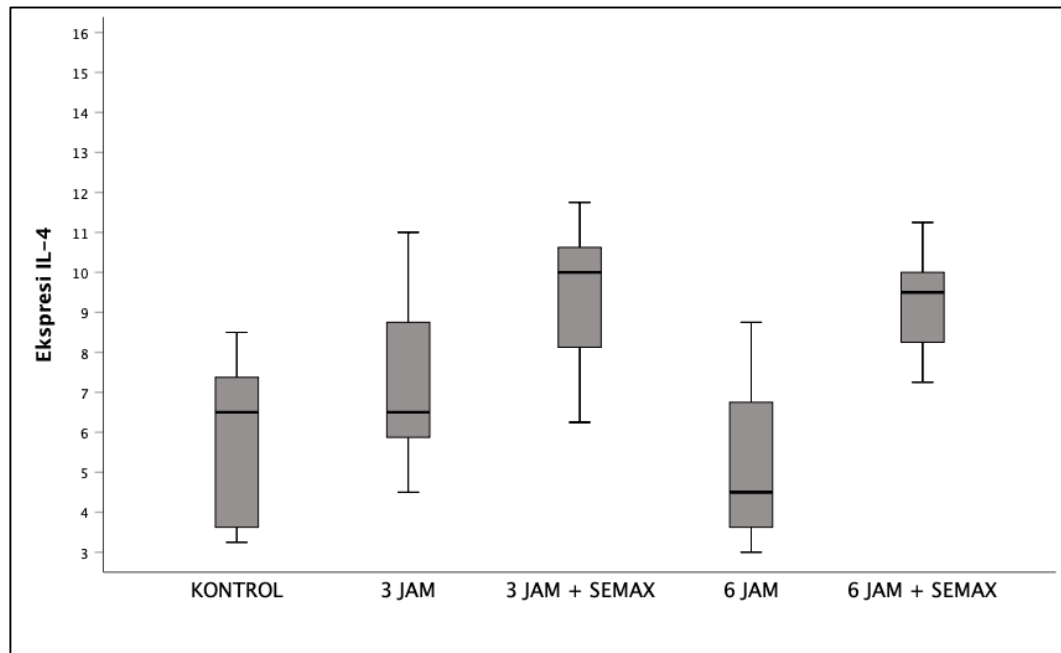
Tabel 5.3 Perbandingan ekspresi *IL-4* pada hewan coba model SCI ringan

Kelompok	Rerata	Simpang Baku	Kelompok	Rerata	Simpang Baku	p
Kontrol	5,96	2,52	NaCl 0,9% 3 jam	6,29	3,40	0,999
			NaCl 0,9% 6 jam	5,61	2,45	0,999
			ACTH4-10 3 jam	10,39	1,67	0,015*
			ACTH4-10 6 jam	8,05	1,62	0,510
NaCl 0,9% 3 jam	6,29	3,40	NaCl 0,9% 6 jam	5,61	2,45	0,984
			ACTH4-10 3 jam	10,39	1,67	0,027*
			ACTH4-10 6 jam	8,05	1,62	0,663
NaCl 0,9% 6 jam	5,61	2,45	ACTH4-10 3 jam	10,39	1,67	0,007*
			ACTH4-10 6 jam	8,05	1,62	0,353
ACTH4-10 3 jam	10,39	1,67	ACTH4-10 6 jam	8,04	1,62	0,382

* nilai p. < 0,05

Tabel 5.3 menunjukkan hasil perbandingan ekspresi *IL-4* pada *ASCI* ringan pada masing-masing kelompok. Berdasarkan nilai p dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa nilai p signifikan ($p < 0.05$) pada kelompok perbandingan ekspresi *IL-4* pada kelompok kontrol terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam, dan kelompok NaCl 0,9% baik yang dikorbankan 3 jam maupun 6 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam, namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 6 jam.

5.3.2 Hasil ekspresi *IL-4* pada kelompok SCI berat



Gambar 5.6 Hasil penilaian ekspresi *IL-4* pada SCI ringan

Pada kelompok *ASCI* berat yang diteteskan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 3 jam dan 6 jam didapatkan hasil ekspresi *IL-4* sebesar $7,32 \pm 2,26$ dan $5,29 \pm 2,16$. Sedangkan untuk kelompok *ASCI* berat yang diberikan *ACTH4-10* dan dikorbankan setelah 3 jam dan 6 jam, didapatkan hasil ekspresi *IL-4* sebesar $9,36 \pm 1,98$ dan $9,21 \pm 1,37$.

Tabel 5.4 Hasil uji komparasi ANOVA ekspresi *IL-4* pada hewan coba model SCI berat

Kelompok	Ekspresi <i>IL-4</i>		
	Rerata	Simpang baku	p
Kontrol	5,75	2,20	0,001
<i>ASCI</i> berat NaCl 0,9% 3 jam	7,32	2,26	
<i>ASCI</i> berat NaCl 0,9% 6 jam	5,29	2,16	
<i>ASCI</i> berat <i>ACTH4-10</i> 3 jam	9,36	1,98	
<i>ASCI</i> berat <i>ACTH4-10</i> 6 jam	9,21	1,37	

* nilai p. < 0,05

Tabel 5.4 menunjukkan hasil penilaian ekspresi *IL-4* masing-masing kelompok. Berdasarkan hasil ekspresi *IL-4* pada masing-masing kelompok dapat dilihat bahwa kelompok dengan pemberian *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 dan 6 jam mempunyai nilai *rerata* yang lebih tinggi dari tanpa pemberian *ACTH4-10*. Didapatkan juga rerata ekspresi *IL-4* pada *ASCI* berat yang diberikan *ACTH4-10* pada jam ke 3 lebih tinggi dibandingkan jam ke 6. Analisis statistik dilanjutkan dengan uji beda *Post Hoc* dengan metode Tukey HSD. Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel 5.5.

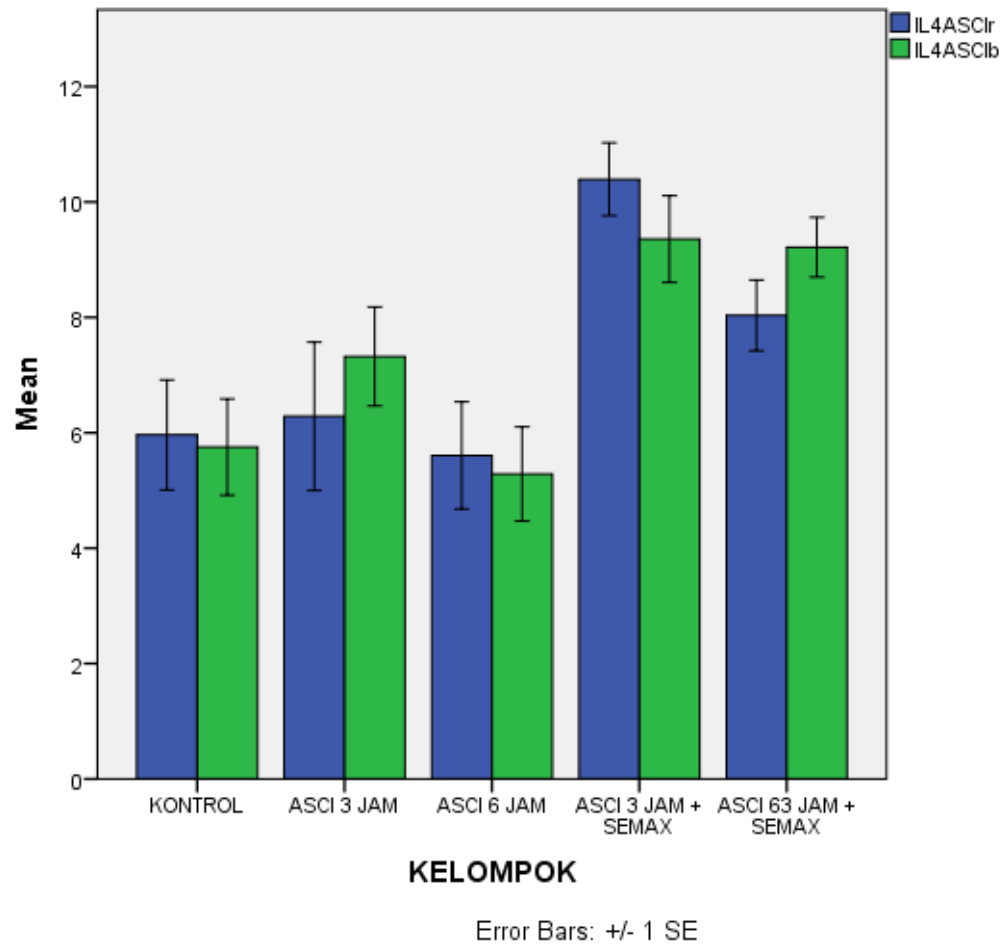
Tabel 5.5 Perbandingan ekspresi *IL-4* pada hewan coba model SCI berat

Kelompok	Rerata	Simpang Baku	Kelompok	Rerata	Simpang Baku	p
Kontrol	5,75	2,20	NaCl 0,9% 3 jam	7,32	2,26	0,600
			NaCl 0,9% 6 jam	5,29	2,16	0,993
			ACTH4-10 3 jam	9,36	1,98	0,018*
			ACTH4-10 6 jam	9,21	1,37	0,025*
NaCl 0,9% 3 jam	7,32	2,26	NaCl 0,9% 6 jam	5,29	2,16	0,349
			ACTH4-10 3 jam	9,36	1,98	0,349
			ACTH4-10 6 jam	9,21	1,37	0,421
NaCl 0,9% 6 jam	5,29	2,16	ACTH4-10 3 jam	9,36	1,98	0,006*
			ACTH4-10 6 jam	9,21	1,37	0,009*
ACTH4-10 3 jam	9,36	1,98	ACTH4-10 6 jam	9,21	1,37	1,000

* nilai $p. < 0,05$

Tabel 5.5 menunjukkan hasil perbandingan ekspresi *IL-4* pada *ASCI* berat pada masing-masing kelompok. Berdasarkan nilai p dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa nilai p signifikan ($p < 0.05$) pada kelompok perbandingan ekspresi *IL-4* pada kelompok kontrol terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam dan 6 jam, dan kelompok NaCl 0,9% yang dikorbankan 6 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam dan 6 jam, namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 6 jam.

5.3.3 Hasil perbandingan ekspresi *IL-4* pada kelompok SCI ringan dan berat



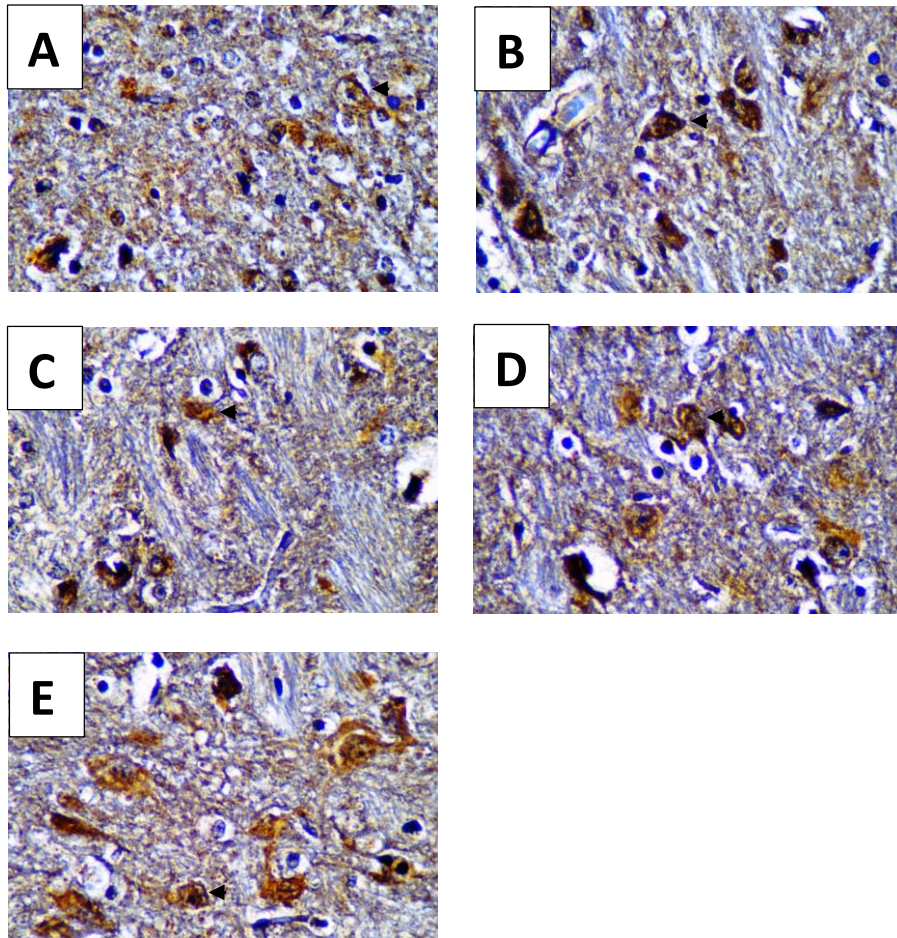
Gambar 5.7 Grafik perbandingan ekspresi *IL-4* pada tiap kelompok

Gambar 5.7 menunjukkan pada *ASCI* ringan, ekspresi *IL-4* tertinggi terdapat pada kelompok *ASCI* 3 jam + *ACTH4-10* dan ekspresi *IL-4* terendah terdapat pada *ASCI* 6 jam. Pada *ASCI* berat, ekspresi *IL-4* tertinggi terdapat pada kelompok *ASCI* 3 jam + *ACTH4-10* dan ekspresi *IL-4* terendah terdapat pada *ASCI* 6 jam.

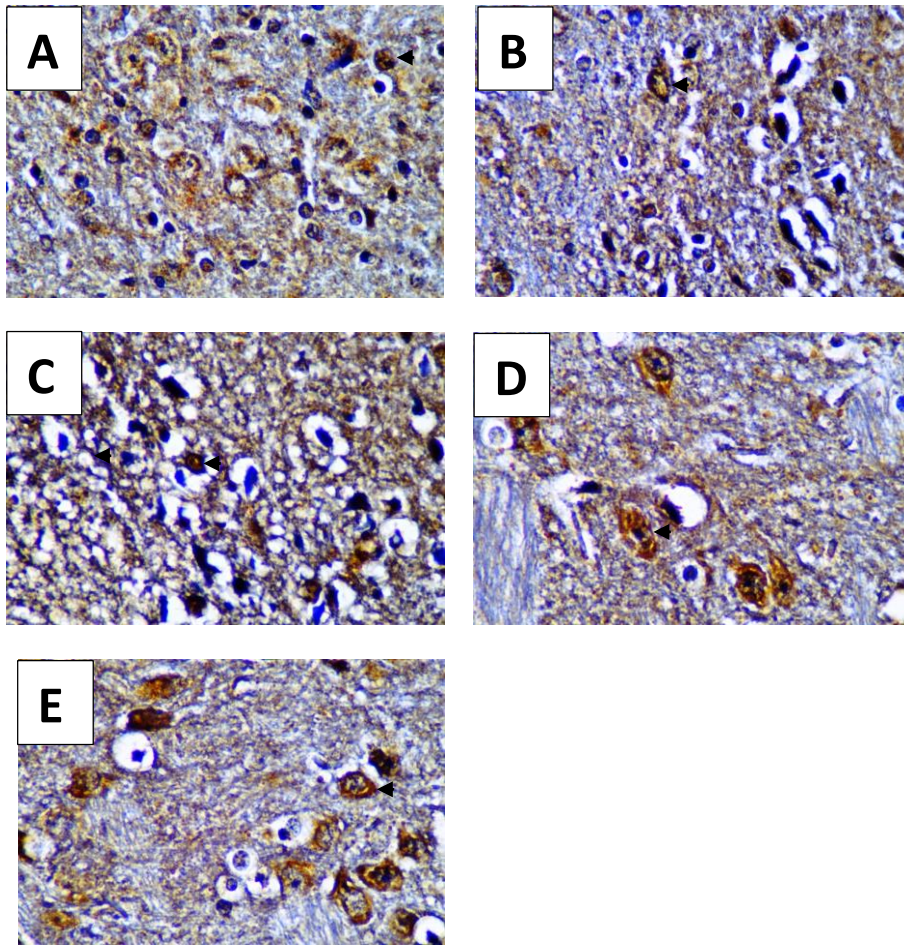
5.4 Ekspresi IL-10 pada Pewarnaan IHC Blok Parafin Hewan Model Cedera Kompresi Akut Medula Spinalis

Sebanyak tiga sampel dari masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan (*aquades* 3 dan 6 jam; *ACTH4-10Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰* 3 dan 6 jam) kompresi ringan dan berat diamati untuk ekspresi imunoreaktif terhadap pewarnaan sitokin *IL-10* untuk menilai reaksi anti-inflamasi *ACTH4-10* pada model cedera medula spinalis (*spinal cord injury* / SCI).

Pewarnaan jaringan medula spinalis hewan coba model cedera medula spinalis paska penjepitan klip aneurisma dilakukan menggunakan anti *IL-10*. Pengamatan pada mikroskop cahaya menghasilkan gambaran sel imunoreaktif yang mengekspresikan *IL-10* paska pemberian antibodi. Hasil pewarnaan medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI ringan disajikan dalam Gambar 5.7 dan pewarnaan medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI berat disajikan dalam Gambar 5.8.



Gambar 5.8 Hasil pengecatan *IHC IL-10* penampang melintang medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI ringan. Panah hitam menunjukkan neuron yang positif mengekspresi *IL-10*. A) Kelompok kontrol. B) Kelompok yang diberikan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 3 jam. C) Kelompok yang diberikan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 6 jam. D) Kelompok yang diberikan *ACTH(4-10)* dan dikorbankan setelah 3 jam. E) Kelompok yang diberikan *ACTH(4-10)* dan dikorbankan setelah 6 jam.

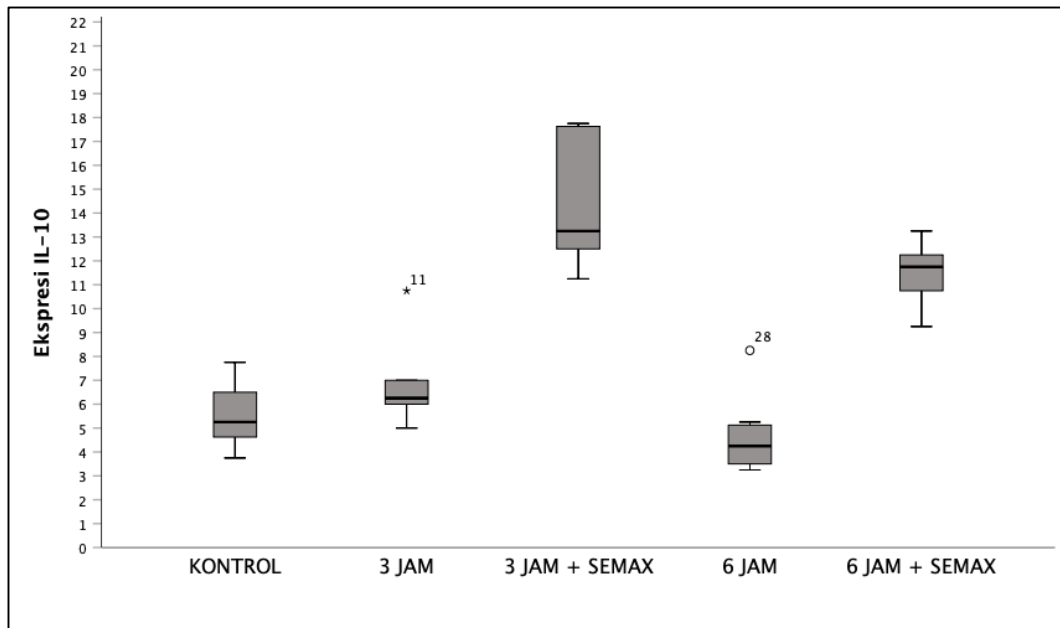


Gambar 5.9 Hasil pengecatan *IHC IL-10* penampang melintang medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI berat. Panah hitam menunjukkan neuron yang positif mengekspresi *IL-10*. A) Kelompok kontrol. B) Kelompok yang diberikan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 3 jam. C) Kelompok yang diberikan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 6 jam. D) Kelompok yang diberikan *ACTH(4-10)* dan dikorbankan setelah 3 jam. E) Kelompok yang diberikan *ACTH(4-10)* dan dikorbankan setelah 6 jam.

5.5 Hasil Uji Statistik Ekspresi *IL-10*

Analisis data tahap pertama dilakukan untuk menguji normalitas distribusi data, menggunakan uji Shapiro-Wilk. Hasil uji tiap kelompok pewarnaan IHC untuk ekspresi *IL-10* menunjukkan nilai $p > 0,05$ yang menandakan data memiliki distribusi yang normal. Analisis statistik dilakukan dengan metode ANOVA dan dilanjutkan oleh uji beda *Post Hoc* dengan metode Tukey.

5.5.1 Hasil ekspresi *IL-10* pada kelompok SCI ringan



Gambar 5.10 Hasil penilaian ekspresi *IL-10* pada SCI ringan

Pada kelompok *ASCI* ringan yang ditetaskan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 3 jam dan 6 jam didapatkan hasil ekspresi *IL-10* sebesar $6,86 \pm 1,84$ dan $4,71 \pm 1,74$. Sedangkan untuk kelompok *ASCI* ringan yang diberikan *ACTH4-10* dan dikorbankan setelah 3 jam dan 6 jam, didapatkan hasil ekspresi *IL-10* sebesar $14,64 \pm 2,89$ dan $11,46 \pm 1,35$.

Tabel 5.6 Hasil uji komparasi ANOVA ekspresi *IL-10* pada hewan coba model SCI ringan

Kelompok	Ekspresi <i>IL-10</i>		
	Rerata	Simpang baku	p
Kontrol	5,57	1,573	<0,001
<i>ASCI</i> ringan NaCl 0,9% 3 jam	6,86	1,848	
<i>ASCI</i> ringan NaCl 0,9% 6 jam	4,71	1,741	
<i>ASCI</i> ringan <i>ACTH4-10</i> 3 jam	14,64	2,893	
<i>ASCI</i> ringan <i>ACTH4-10</i> 6 jam	11,46	1,350	

* nilai p. < 0,05

Tabel 5.6 menunjukkan hasil penilaian ekspresi *IL-10* masing-masing kelompok hewan coba model SCI ringan. Berdasarkan hasil ekspresi *IL-10* pada masing-masing kelompok dapat dilihat bahwa kelompok dengan pemberian *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 dan 6 jam mempunyai nilai *rerata* yang lebih tinggi dari tanpa pemberian *ACTH4-10Pro⁸-Gly⁹-Pro¹*. Didapatkan juga rerata ekspresi *IL-10* pada *ASCI* ringan yang diberikan *ACTH4-10* pada jam ke 3 lebih tinggi dibandingkan jam ke 6. Analisis statistik dilanjutkan dengan uji beda *Post Hoc* dengan metode Tukey HSD. Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel 5.7.

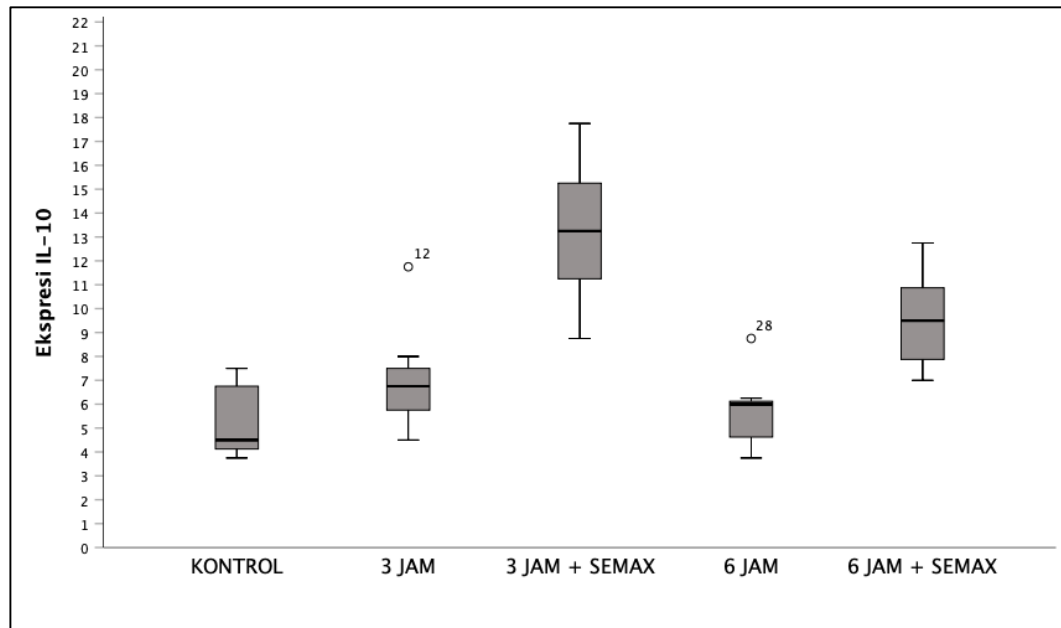
Tabel 5.7 Perbandingan ekspresi *IL-10* pada hewan coba model SCI ringan

Kelompok	Rerata	Simpang Baku	Kelompok	Rerata	Simpang Baku	p
Kontrol	5,57	1,573	NaCl 0,9% 3 jam	6,86	1,848	0,734
			NaCl 0,9% 6 jam	4,71	1,741	0,922
			ACTH4-10 3 jam	14,64	2,893	< 0,001*
			ACTH4-10 6 jam	11,46	1,350	< 0,001*
NaCl 0,9% 3 jam	6,86	1,848	NaCl 0,9% 6 jam	4,71	1,741	0,268
			ACTH4-10 3 jam	14,64	2,893	< 0,001*
			ACTH4-10 6 jam	11,46	1,350	< 0,001*
NaCl 0,9% 6 jam	4,71	1,741	ACTH4-10 3 jam	14,64	2,893	< 0,001*
			ACTH4-10 6 jam	11,46	1,350	< 0,001*
ACTH4-10 3 jam	14,64	2,893	ACTH4-10 6 jam	11,46	1,350	0,036*

*nilai p. < 0,05

Tabel 5.7 menunjukkan hasil perbandingan ekspresi *IL-10* pada *ASCI* ringan pada masing-masing kelompok. Berdasarkan nilai p dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa nilai p signifikan ($p < 0.05$) pada perbandingan ekspresi *IL-10* pada kelompok kontrol terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam dan 6 jam, dan kelompok NaCl 0,9% yang dikorbankan 3 jam dan 6 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam dan 6 jam, dan kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 6 jam.

5.5.2 Hasil ekspresi *IL-10* pada kelompok SCI berat



Gambar 5.11 Hasil penilaian ekspresi *IL-10* pada SCI berat

Pada kelompok *ASCI* berat yang ditetaskan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 3 jam dan 6 jam didapatkan hasil ekspresi *IL-10* sebesar $7,07 \pm 2,34$ dan $5,71 \pm 1,62$. Sedangkan untuk kelompok *ASCI* berat yang diberikan *ACTH4-10* dan dikorbankan setelah 3 jam dan 6 jam, didapatkan hasil ekspresi *IL-10* sebesar $13,25 \pm 3,08$ dan $9,54 \pm 2,13$.

Tabel 5.8 Hasil uji komparasi ANOVA ekspresi *IL-10* pada hewan coba model SCI berat

Kelompok	Ekspresi <i>IL-10</i>		p
	Rerata	Simpang baku	
Kontrol	5,36	1,587	<0,001
<i>ASCI</i> berat NaCl 0,9% 3 jam	7,07	2,344	
<i>ASCI</i> berat NaCl 0,9% 6 jam	5,71	1,629	
<i>ASCI</i> berat <i>ACTH4-10</i> 3 jam	13,25	3,086	
<i>ASCI</i> berat <i>ACTH4-10</i> 6 jam	9,54	2,138	

*nilai p. < 0,05

Tabel 5.8 menunjukkan hasil penilaian ekspresi *IL-10* masing-masing kelompok. Berdasarkan hasil ekspresi *IL-10* pada masing-masing kelompok dapat dilihat bahwa kelompok dengan pemberian *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 dan 6 jam mempunyai nilai *rerata* yang lebih tinggi dari tanpa pemberian *ACTH4-10Pro⁸-Gly⁹-Pro¹*. Didapatkan juga rerata ekspresi *IL-10* pada *ASCI* berat yang diberikan *ACTH4-10* pada jam ke 3 lebih tinggi dibandingkan jam ke 6. Analisis statistik dilanjutkan dengan uji beda *Post Hoc* dengan metode Tukey HSD. Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel 5.9.

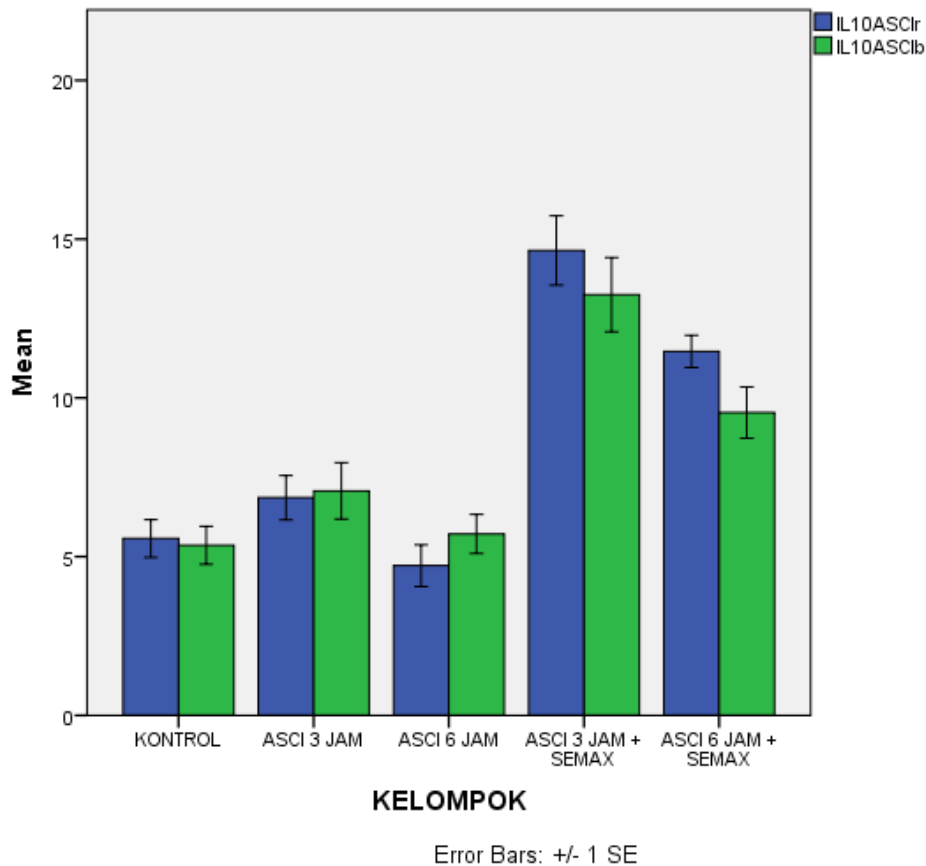
Tabel 5.9 Perbandingan ekspresi *IL-10* pada hewan coba model SCI berat

Kelompok	Rerata	Simpang Baku	Kelompok	Rerata	Simpang Baku	p
Kontrol	5,36	1,587	NaCl 0,9% 3 jam	7,07	2,344	0,607
			NaCl 0,9% 6 jam	5,71	1,629	0,998
			ACTH4-10 3 jam	13,25	3,086	<0,001*
			ACTH4-10 6 jam	9,54	2,138	0,012
NaCl 0,9% 3 jam	7,07	2,344	NaCl 0,9% 6 jam	5,71	1,629	0,784
			ACTH4-10 3 jam	13,25	3,086	<0,001*
			ACTH4-10 6 jam	9,54	2,138	0,258
NaCl 0,9% 6 jam	5,71	1,629	ACTH4-10 3 jam	13,25	3,086	<0,001*
			ACTH4-10 6 jam	9,54	2,138	0,024*
ACTH4-10 3 jam	13,25	3,086	ACTH4-10 6 jam	9,54	2,138	0,030*

* nilai p. < 0,05

Tabel 5.9 menunjukkan hasil perbandingan ekspresi *IL-10* pada *ASCI* berat pada masing-masing kelompok. Berdasarkan nilai p dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa nilai p signifikan ($p < 0.05$) pada perbandingan ekspresi *IL-10* pada kelompok kontrol terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam, kelompok NaCl 0,9% yang dikorbankan 3 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam, kelompok NaCl 0,9% yang dikorbankan 6 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam dan 6 jam, kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 6 jam.

5.5.3 Hasil perbandingan ekspresi *IL-10* pada kelompok SCI ringan dan berat



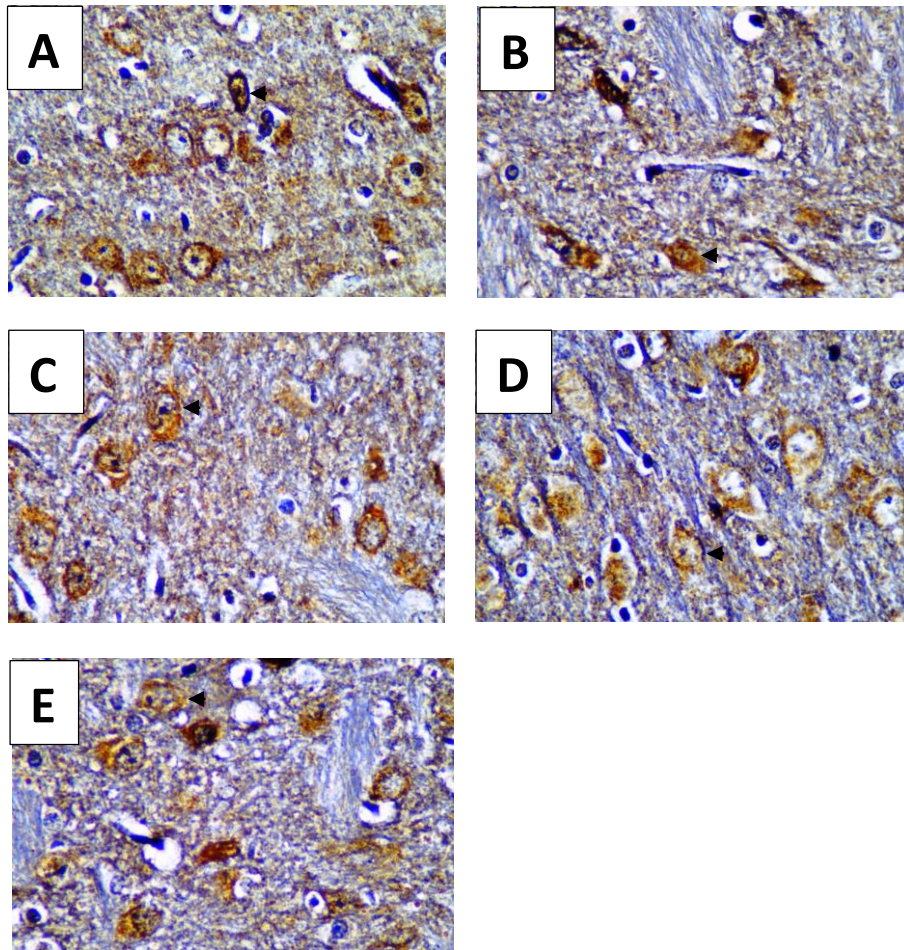
Gambar 5.12 Grafik perbandingan ekspresi *IL-10* pada tiap kelompok

Gambar 5.12 menunjukkan pada *ASCI* ringan, ekspresi *IL-10* tertinggi terdapat pada kelompok *ASCI* 3 jam + *ACTH4-10* dan ekspresi *IL-10* terendah terdapat pada *ASCI* 6 jam. Pada *ASCI* berat, ekspresi *IL-10* tertinggi terdapat pada kelompok *ASCI* 3 jam + *ACTH4-10* dan ekspresi *IL-10* terendah terdapat pada kelompok kontrol.

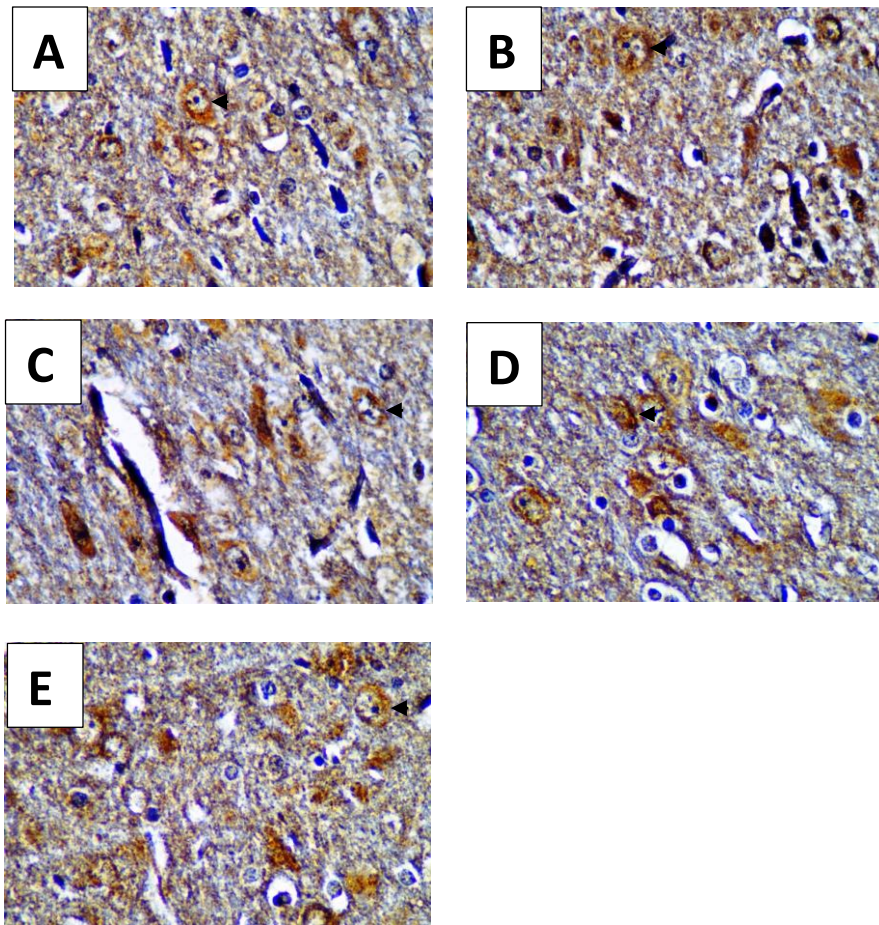
5.6 Ekspresi IL-13 pada Pewarnaan IHC Blok Parafin Hewan Model Cedera Kompresi Akut Medula Spinalis

Sebanyak tiga sampel dari masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan (*aquades* 3 dan 6 jam; *ACTH4-10Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰* 3 dan 6 jam) kompresi ringan dan berat diamati untuk ekspresi imunoreaktif terhadap pewarnaan sitokin *IL-13* untuk menilai reaksi anti-inflamasi *ACTH4-10* pada model cedera medula spinalis (*spinal cord injury* / SCI).

Pewarnaan jaringan medula spinalis hewan coba model cedera medula spinalis paska penjepitan klip aneurisma dilakukan menggunakan anti *IL-13*. Pengamatan pada mikroskop cahaya menghasilkan gambaran sel imunoreaktif yang mengekspresikan *IL-13* paska pemberian antibodi. Hasil pewarnaan medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI ringan disajikan dalam Gambar 5.12 dan pewarnaan medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI berat disajikan dalam Gambar 5.13.



Gambar 5.13 Hasil pengecatan *IHC IL-13* penampang melintang medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI ringan. Panah hitam menunjukkan neuron yang positif mengekspresi *IL-13*. A) Kelompok kontrol. B) Kelompok yang diberikan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 3 jam. C) Kelompok yang diberikan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 6 jam. D) Kelompok yang diberikan *ACTH(4-10)* dan dikorbankan setelah 3 jam. E) Kelompok yang diberikan *ACTH(4-10)* dan dikorbankan setelah 6 jam.

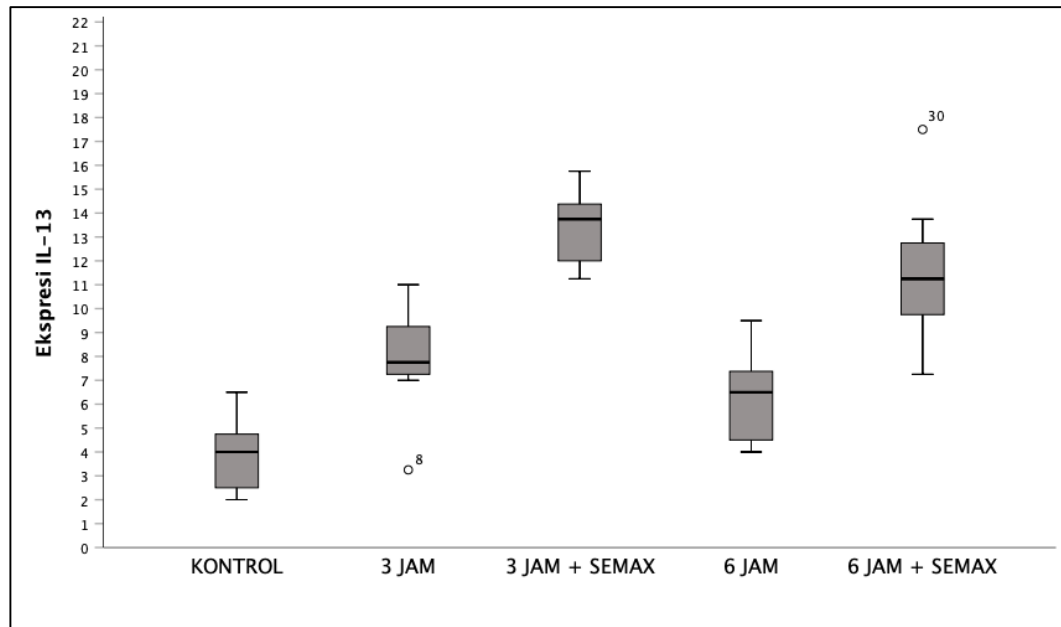


Gambar 5.14 Hasil pengecatan *IHC IL-13* penampang melintang medula spinalis tikus dengan perlakuan SCI berat. Panah hitam menunjukkan neuron yang positif mengekspresi *IL-13*. A) Kelompok kontrol. B) Kelompok yang diberikan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 3 jam. C) Kelompok yang diberikan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 6 jam. D) Kelompok yang diberikan *ACTH(4-10)* dan dikorbankan setelah 3 jam. E) Kelompok yang diberikan *ACTH(4-10)* dan dikorbankan setelah 6 jam.

5.7 Hasil Uji Statistik Ekspresi *IL-13*

Analisis data tahap pertama dilakukan untuk menguji normalitas distribusi data, menggunakan uji Shapiro-Wilk. Hasil uji tiap kelompok pewarnaan IHC untuk ekspresi *IL-13* menunjukkan nilai $p > 0,05$ yang menandakan data memiliki distribusi yang normal. Analisis statistik dilakukan dengan metode ANOVA dan dilanjutkan oleh uji beda *Post Hoc* dengan metode Tukey.

5.7.1 Hasil ekspresi *IL-13* pada kelompok SCI ringan



Gambar 5.15 Hasil penilaian ekspresi *IL-13* pada SCI ringan

Pada kelompok *SCI* ringan yang ditetaskan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 3 jam dan 6 jam didapatkan hasil ekspresi *IL-13* sebesar $7,86 \pm 2,44$ dan $6,25 \pm 2,04$. Sedangkan untuk kelompok *ASCI* ringan yang diberikan *ACTH4-10* dan dikorbankan setelah 3 jam dan 6 jam, didapatkan hasil ekspresi *IL-13* sebesar $13,36 \pm 1,67$ dan $11,57 \pm 3,31$.

Tabel 5.10 Hasil uji komparasi ANOVA ekspresi *IL-13* pada hewan coba model SCI ringan

Kelompok	Ekspresi <i>IL-13</i>		p
	Rerata	Simpang baku	
Kontrol	3,86	1,682	<0,001
<i>ASCI</i> ringan NaCl 0,9% 3 jam	7,86	2,445	
<i>ASCI</i> ringan NaCl 0,9% 6 jam	6,25	2,046	
<i>ASCI</i> ringan <i>ACTH4-10</i> 3 jam	13,36	1,676	
<i>ASCI</i> ringan <i>ACTH4-10</i> 6 jam	11,57	3,313	

Tabel 5.10 menunjukkan hasil penilaian ekspresi *IL-13* masing-masing kelompok hewan coba model SCI ringan. Berdasarkan hasil ekspresi *IL-13* pada masing-masing kelompok dapat dilihat bahwa kelompok dengan pemberian *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 dan 6 jam mempunyai nilai *rerata* yang lebih tinggi dari tanpa pemberian *ACTH4-10Pro⁸-Gly⁹-Pro¹*. Didapatkan juga rerata ekspresi *IL-13* pada *ASCI* ringan yang diberikan *ACTH4-10* pada jam ke 3 lebih tinggi dibandingkan jam ke 6. Analisis statistik dilanjutkan dengan uji beda *Post Hoc* dengan metode Tukey HSD. Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel 5.11.

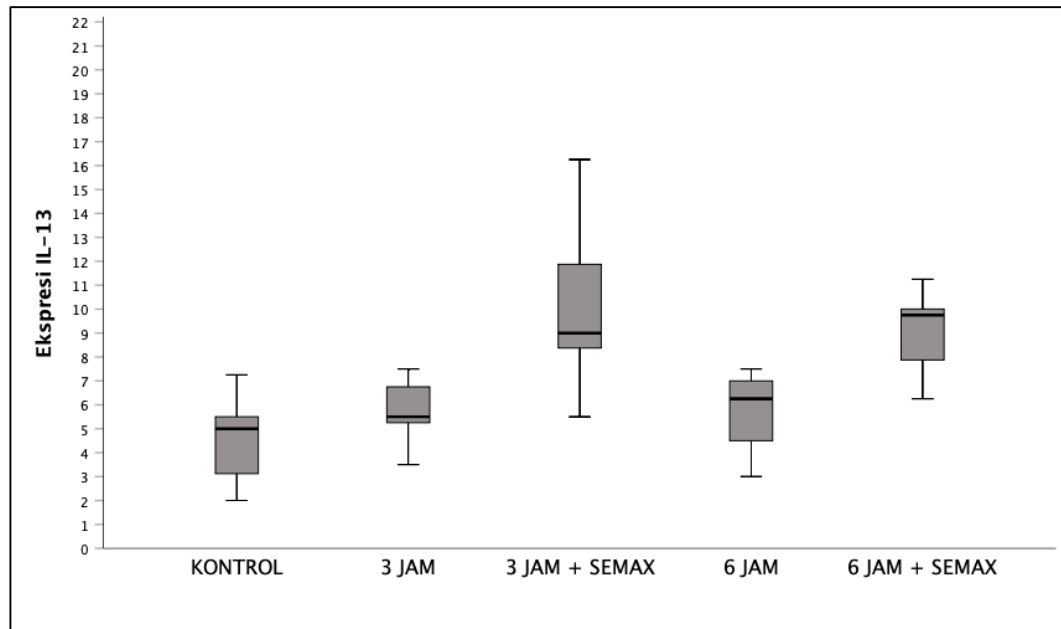
Tabel 5.11 Perbandingan ekspresi *IL-13* pada hewan coba model SCI ringan

Kelompok	Rerata	Simpang Baku	Kelompok	Rerata	Simpang Baku	p
Kontrol	3,86	1,682	NaCl 0,9% 3 jam	7,86	2,445	0,023*
			NaCl 0,9% 6 jam	6,25	2,046	0,322
			ACTH4-10 3 jam	13,36	1,676	<0,001*
			ACTH4-10 6 jam	11,57	3,313	<0,001*
NaCl 0,9% 3 jam	7,86	2,445	NaCl 0,9% 6 jam	6,25	2,046	0,694
			ACTH4-10 3 jam	13,36	1,676	0,001*
			ACTH4-10 6 jam	11,57	3,313	0,040*
NaCl 0,9% 6 jam	6,25	2,046	ACTH4-10 3 jam	13,36	1,676	<0,001*
			ACTH4-10 6 jam	11,57	3,313	0,001*
ACTH4-10 3 jam	13,36	1,676	ACTH4-10 6 jam	11,57	3,313	0,605

* nilai p. < 0,05

Tabel 5.11 menunjukkan hasil perbandingan ekspresi *IL-13* pada hewan coba model SCI ringan masing-masing kelompok. Berdasarkan nilai p dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa nilai p signifikan ($p < 0.05$) pada perbandingan ekspresi *IL-13* pada kelompok kontrol terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam dan 6 jam, kelompok NaCl 0,9% yang dikorbankan 3 jam dan 6 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam dan 6 jam, namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 6 jam.

5.7.2 Hasil ekspresi *IL-13* pada kelompok SCI berat



Gambar 5.16 Hasil penilaian ekspresi *IL-13* pada SCI berat

Pada kelompok *SCI* berat yang ditetaskan NaCl 0,9% dan dikorbankan setelah 3 jam dan 6 jam didapatkan hasil ekspresi *IL-13* sebesar $5,79 \pm 1,41$ dan $5,68 \pm 1,71$. Sedangkan untuk kelompok *ASCI* berat yang diberikan *ACTH4-10* dan dikorbankan setelah 3 jam dan 6 jam, didapatkan hasil ekspresi *IL-13* sebesar $10,18 \pm 3,57$ dan $9,00 \pm 1,89$.

Tabel 5.12 Hasil uji komparasi ANOVA ekspresi *IL-13* pada hewan coba model *SCI* berat

Kelompok	Ekspresi <i>IL-13</i>		p
	Rerata	Simpang baku	
Kontrol	4,50	1,893	<0,001
<i>ASCI</i> berat NaCl 0,9% 3 jam	5,79	1,410	
<i>ASCI</i> berat NaCl 0,9% 6 jam	5,68	1,718	
<i>ASCI</i> berat <i>ACTH4-10</i> 3 jam	10,18	3,570	
<i>ASCI</i> berat <i>ACTH4-10</i> 6 jam	9,00	1,893	

Tabel 5.10 menunjukkan hasil penilaian ekspresi *IL-13* masing-masing kelompok hewan coba model SCI berat. Berdasarkan hasil ekspresi *IL-13* pada masing-masing kelompok dapat dilihat bahwa kelompok dengan pemberian *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 dan 6 jam mempunyai nilai *rerata* yang lebih tinggi dari tanpa pemberian *ACTH4-10Pro⁸-Gly⁹-Pro¹*. Didapatkan juga rerata ekspresi *IL-13* pada *ASCI* berat yang diberikan *ACTH4-10* pada jam ke 3 lebih tinggi dibandingkan jam ke 6. Analisis statistik dilanjutkan dengan uji beda *Post Hoc* dengan metode Tukey HSD. Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel 5.13.

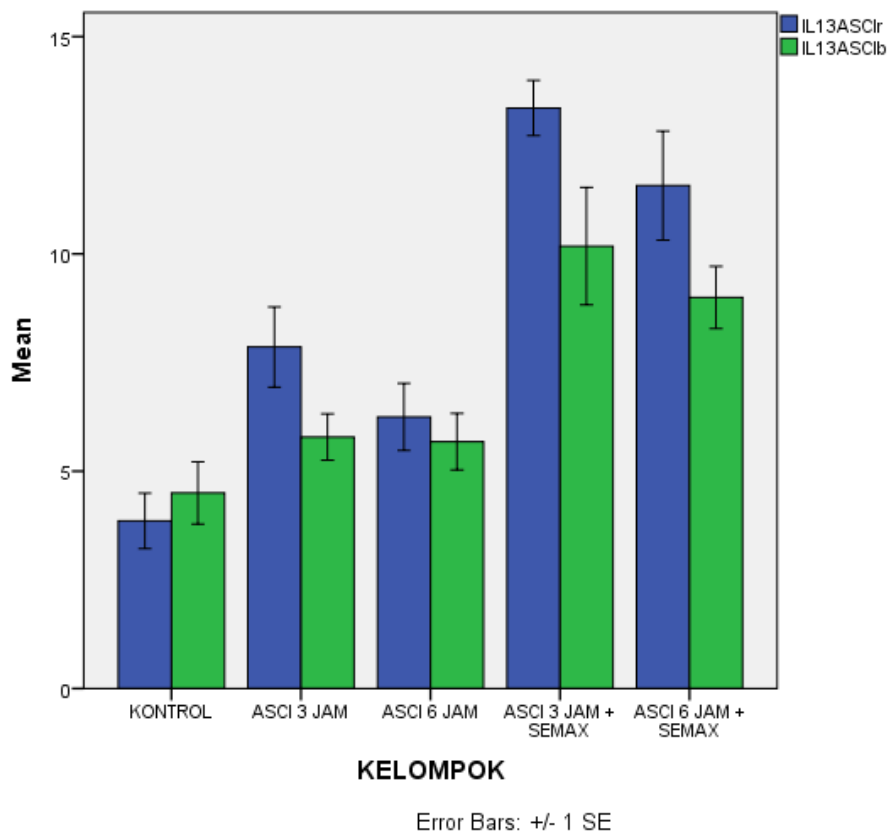
Tabel 5.13 Perbandingan ekspresi *IL-13* pada hewan coba model SCI berat

Kelompok	Rerata	Simpang Baku	Kelompok	Rerata	Simpang Baku	p
Kontrol	4,50	1,893	NaCl 0,9% 3 jam	5,79	1,410	0,816
			NaCl 0,9% 6 jam	5,68	1,718	0,858
			ACTH4-10 3 jam	10,18	3,570	<0,001
			ACTH4-10 6 jam	9,00	1,893	0,006*
NaCl 0,9% 3 jam	5,79	1,410	NaCl 0,9% 6 jam	5,68	1,718	1.000
			ACTH4-10 3 jam	10,18	3,570	0,007*
			ACTH4-10 6 jam	9,00	1,893	0,078
NaCl 0,9% 6 jam	5,68	1,718	ACTH4-10 3 jam	10,18	3,570	0,006*
			ACTH4-10 6 jam	9,00	1,893	0,064
ACTH4-10 3 jam	10,18	3,570	ACTH4-10 6 jam	9,00	1,893	0,858

* nilai p. < 0,05

Tabel 5.13 menunjukkan hasil perbandingan ekspresi *IL-13* pada hewan coba model SCI berat masing-masing kelompok. Berdasarkan nilai p dari tabel tersebut dapat dilihat bahwa nilai p signifikan ($p < 0.05$) pada perbandingan ekspresi *IL-13* pada kelompok kontrol terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 6 jam, kelompok NaCl 0,9% yang dikorbankan 3 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam, kelompok NaCl 0,9% yang dikorbankan 6 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam, namun tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 3 jam terhadap kelompok *ACTH4-10* yang dikorbankan 6 jam.

5.7.3 Hasil perbandingan ekspresi *IL-13* pada kelompok SCI ringan dan berat



Gambar 5.17 Grafik perbandingan ekspresi *IL-13* pada tiap kelompok

Gambar 5.17 menunjukkan pada *ASCI* ringan, ekspresi *IL-13* tertinggi terdapat pada kelompok *ASCI* 3 jam + *ACTH4-10* dan ekspresi *IL-13* terendah terdapat pada kelompok kontrol. Pada *ASCI* berat, ekspresi *IL-13* tertinggi terdapat pada kelompok *ASCI* 3 jam + *ACTH4-10* dan ekspresi *IL-13* terendah terdapat pada kelompok kontrol.

BAB 6

PEMBAHASAN

Spinal cord injury (SCI) atau cedera korda spinalis adalah cedera yang menyebabkan perubahan, baik bersifat sementara atau permanen, pada fungsi motorik, sensori, atau autonom normal dari korda spinalis (Fehling *et al.*, 2012). Terdapat empat mekanisme cedera primer pada medula spinalis, pertama adalah dampak cedera disertai kompresi persisten, kedua dampak cedera disertai kompresi sementara, ketiga distraksi, dan keempat yaitu laserasi atau transeksi (Subagio, 2011).

Mengikuti cedera primer yang terjadi, cedera korda spinalis selanjutnya memicu terjadinya inflamasi melalui aktivasi respon immune innate yang berkontribusi pada terjadinya cedera sekunder seperti apoptosis pada oligodendrosit, demielinisasi, degenerasi akson, dan kematian neuron (Fleming *et al.*, 2006). Proses terjadinya cedera sekunder ini lah yang kemudian mendasari gagasan bahwa penekanan proses inflamasi pada cedera korda spinalis berpeluang untuk mengurangi kerusakan sel sekunder serta mendukung regenerasi neuron (Sica and Mantovani, 2012).

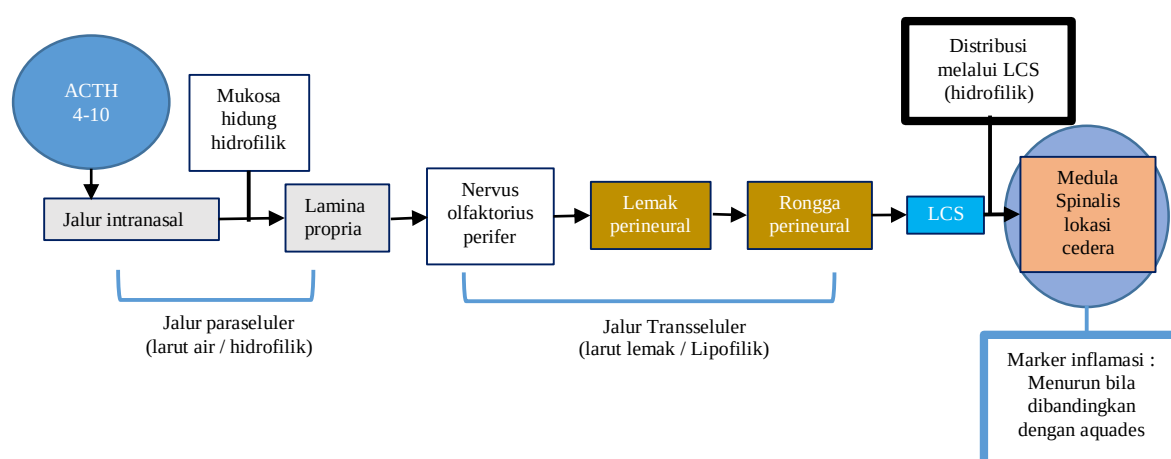
Respon inflamasi yang terjadi pada cedera korda spinalis diatur oleh makrofag yang terakumulasi di pusat cedera (Murray and Wynn, 2011). Penelitian baru-baru ini menemukan bahwa makrofag memiliki plastisitas yang tinggi dan dapat merubah sifat fenotip dan fungsinya sesuai dengan perubahan mikroenviroment. Beberapa jenis makrofag yang telah diketahui memiliki fungsi

yang berbeda adalah M1 (aktivasi klasik), M2 (aktivasi alternatif), makrofag regulator dan *tumor associated makrofag* (TAM) (Fleming *et al.*, 2006).

Makrofag M1 yang di induksi oleh Th1 memproduksi sitokin-sitokin pro-inflamasi (*TNF- α* , *IL-1*), *reactive oxygen species* (ROS), dan *nitrite oxide* (NO) yang berkontribusi dalam inflamasi dan kerusakan jaringan. Berbeda dengan makrofag M1, tipe M2 yang di induksi oleh Th2 memiliki peranan dalam produksi faktor-faktor anti inflamasi. Makrofag M2 dapat dibagi menjadi tiga sub grup berdasarkan tipe stimulasi dan ekspresi molekul dan sitokin nya, makrofag M2a di induksi oleh *IL-4* dan *IL-13*, M2b di induksi oleh agonis *toll-like receptor* (TLRs), dan M2c di induksi oleh *IL-10*, *TGF- β* , dan glukocorticoid (Mantovani *et al.*, 2004). Oleh karenanya upaya terapi pada cedera korda spinalis dapat dilakukan dengan jalan menghambat aktivasi M1 dan/atau menginduksi M2 (Orr and Gensel, 2018).

ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰ adalah heptapeptide dan analog sintetik dari fragmen hormone adrenokortikotropik (ACTH) dengan penggantian tiga asam amino C terminal dengan urutan pro-gly-pro (Medvedeva *et al.*, 2014). *ACTH₄₋₁₀Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰* dikatakan dapat berikatan dengan reseptor melanocortin sehingga dapat memberikan efek anti inflamasi dan neuroprotektif (Bertolini, 2012). Efek anti inflamasi akibat aktifnya reseptor melanocortin dihasilkan melalui beberapa jalur yaitu, supresi sitokin pro inflamasi (*TNF- α* , *IL-1*, *IL-6* dan *IL-8*), induksi sitokin anti inflamasi (*IL-4*, *IL-10*, *IL-13*), supresi mediator pro inflamasi non sitokin (*NO*, *PGE₂*, *ROS*, *ICAM-1*) dan inhibisi faktor transkripsi (*NF- κ B*) (Wang *et al.*, 2019).

Pemberian *ACTH 4-10* mampu mencapai lokasi cedera pada medula spinalis pada pemberian intranasal. Pemberian *ACTH 4-10* intranasal akan mengalami penyerapan melalui mukosa yang bersifat hidrofilik. Penyerapan berlanjut dengan melalui jalur para-seluler menembus lamina propria menuju nervus olfaktorius. *ACTH 4-10* melewati nervus olfaktorius menuju lemak perineural yang kemudian sampai di rongga perineural dan menyebar melalui LCS menuju lokasi cedera medula spinalis pada hewan coba tikus model cedera medula spinalis. Efek kerja antiinflamasi *ACTH 4-10* ditandai dengan penurunan ekspresi sitokin inflamasi dan jumlah neutrofil paska pewarnaan pada jaringan medula spinalis (Faris *et al.*, 2021).



Gambar 6.1 Skema jalur perjalanan *ACTH 4-10* melalui jalur intranasal menuju lokasi cedera medula spinalis (Faris *et al.*, 2021)

6.1 Ekspresi *IL-4* pada Hewan Coba Tikus *Sprague-Dawley* dengan Perlakuan SCI ringan dan berat, pada jam ke-3 dan ke-6

IL-4 merupakan citokine yang dihasilkan oleh *Th2*, sel mast, eosinofil dan basophil. Setelah teraktivasi *IL-4* dapat memberikan umpan positif untuk merangsang pembentukan *IL-4* yang lebih banyak. *IL-4* merupakan sitokin yang

memiliki efek anti-inflamasi, hal ini dikaitkan dengan kemampuannya dalam menekan produksi *TNF- α* dan *IL-1* (Fenton *et al.*, 1992). Selain menekan produksi *TNF- α* dan *IL-1*, *IL-4* juga berperan dalam mengkonversi M1 yang memproduksi sitokin proinflamasi menjadi M2 yang selanjutnya akan menghasilkan sitokin anti-inflamasi (Goerdt *et al.*, 1999; Mantovani *et al.*, 2007).

Pada penelitian ini didapatkan hasil yang bermakna terhadap peningkatan ekspresi *IL-4* pada kelompok yang diberikan *ACTH4-10* setelah cedera kompresi ringan pada jam ke 3 dibandingkan kelompok placebo namun tidak pada jam ke 6. Pada kompresi berat peningkatan ekspresi *IL-4* pada kelompok yang diberikan *ACTH4-10* bermakna pada jam ke 6 namun tidak pada jam ke 3.

Hal ini kemungkinan dapat disebabkan oleh regulasi *IL-4* yang dihasilkan *Th2* dapat ditekan oleh sitokin pro-inflamasi seperti *NF-KB* dan interferon regulatory factor 1 (IRF1) (Li-Weber and Krammer, 2003). Pada trauma kompresi ringan jam ke 3 respon inflamasi yang terjadi belum terlalu berat sehingga efektivitas dari pemberian *ACTH4-10* terhadap peningkatan ekspresi *IL-4* dibandingkan dengan placebo dapat tampak secara bermakna. Namun seiring terus berjalannya proses inflamasi pada jam ke 6 ekspresi *IL-4* pada kelompok dengan pemberian *ACTH4-10* menjadi tidak bermakna dibandingkan kelompok placebo akibat penekanan ekspresi *IL-4* oleh meningkatnya sitokin pro inflamasi.

Sejalan dengan pembahasan sebelumnya, trauma kompresi berat sudah menimbulkan respon inflamasi yang berat sejak jam ke 3, sehingga ekspresi *IL-4* pada kelompok dengan pemberian *ACTH4-10* dibandingkan placebo tidak tampak secara bermakna. Berbeda dengan kelompok kompresi ringan ekspresi *IL-4* pada kompresi berat jam ke 6 dengan pemberian *ACTH4-10* mengalami peningkatan

yang bermakna dibandingkan placebo. Hal ini kemungkinan dapat disebabkan oleh variasi ekspresi *IL-4* pada tiap individu dapat berbeda dipengaruhi oleh polimorfisme pada koding gen masing-masing. Respon inflamasi pada individu dengan CTI/TTD halotype (HAP-1) mengekspresikan lebih banyak *IL-4* dibandingkan TCI/CCI halotype (HAP-2).

6.2 Ekspresi *IL-10* pada Hewan Coba Tikus *Sprague-Dawley* dengan Perlakuan SCI ringan dan berat, pada jam ke-3 dan ke-6

IL-10 merupakan sitokin anti-inflamasi yang sangat poten dan berperan penting dalam membatasi respon inflamasi dan mempertahankan homeostasis pada jaringan. *IL-10* disekresi terutama oleh makrofag dan sebagian kecil dari limfosit, *Th2* dan sel mast (Iyer and Cheng, 2012). Aktivasi MC1 dan MC3 pada makrofag oleh ACTH, α MSH, dan agonis melanokortin dapat menekan sitokin-sitokin pro-inflamasi dan meningkatkan mediator anti-inflamasi seperti *IL-10* (Patel *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini didapatkan hasil yang bermakna terhadap peningkatan ekspresi *IL-10* pada kelompok yang diberikan ACTH4-10 setelah cedera kompresi ringan baik pada jam ke 3 dan ke 6 dibandingkan kelompok placebo. Pada kompresi berat peningkatan ekspresi *IL-10* juga didapatkan bermakna pada kelompok yang diberikan ACTH4-10 baik pada jam ke 3 dan jam ke 6 dibandingkan kelompok placebo.

Hal ini sejalan dengan teori bahwa ikatan ACTH4-10 dengan reseptor melanokortin dapat memicu produksi *IL-10*. Peningkatan kadar *IL-10* pada kelompok perlakuan menunjukkan bahwa pemberian ACTH4-10 dapat

memberikan dampak anti-inflamasi pada cedera korda spinalis yang diharapkan menekan cedera sekunder yang terjadi.

6.3 Ekspresi *IL-13* pada Hewan Coba Tikus *Sprague-Dawley* dengan Perlakuan SCI ringan dan berat, pada jam ke-3 dan ke-6

IL-13 merupakan sitokin anti-inflamasi yang disekresi oleh *Th2*, sel mast, basophil, dan eosinofil. *IL-13* berasal dari *IL-23* yang menginduksi *Th0* menjadi *Th17* menghasilkan *IL-17* dan merangsang *Th2* menghasilkan *IL-13*. *IL-13* merupakan homolog dari *IL-4* dan keduanya memiliki banyak aktifitas biologi yang sama terhadap respon inflamasi. *IL-13* dapat memodulasi makrofag untuk menjadi M2 yang berperan dalam menekan inflamasi (de Vries, 1998). Dari beberapa penelitian eksperimental pada hewan coba diketahui bahwa *IL-13* dapat memberikan efek neuroprotektif pada kelainan degeneratif neuronal dengan penekanan sekresi sitokin pro-inflamasi, menurunkan infiltrasi sel-sel inflamasi dan menekan kerusakan akson (Ochoa-Repáraz *et al.*, 2008; Offner *et al.*, 2005).

Pada penelitian ini didapatkan hasil yang bermakna terhadap peningkatan ekspresi *IL-13* pada kelompok yang diberikan *ACTH4-10* setelah cedera kompresi ringan baik pada jam ke 3 dan ke 6 dibandingkan kelompok placebo. Pada kompresi berat peningkatan ekspresi *IL-13* didapatkan bermakna pada kelompok yang diberikan *ACTH4-10* pada jam ke 3 namun tidak pada jam ke 6 dibandingkan placebo.

Serupa dengan *IL-4* sekresi *IL-13* oleh *Th-2* juga dapat ditekan oleh sitokin pro-inflamasi seperti *IL-10* dan *TGF-B*. Hal ini lah yang kemungkinan dapat menjelaskan temuan kami bahwa pada trauma kompresi berat jam ke 6 dimana

proses inflamasi yang terjadi sangat berat pemberian *ACTH4-10* tidak menunjukkan peningkatan *IL-13* secara bermakna dibandingkan kelompok placebo.

Penjelasan lain yang mungkin menjelaskan hasil temuan kami dimana pada jam ke 6 baik pada trauma kompresi ringan maupun berat ekspresi *sitokin* anti inflamasi (*IL-4*, *IL-10*, *IL-13*) cenderung lebih rendah dibandingkan pada jam ke 3 adalah farmako kinetik dan dinamik dari *ACTH4-10* yang time dependent, spesifik dan reversible (Dolotov *et al.*, 2004). *ACTH4-10* mulai ditemukan di CNS dalam beberapa menit setelah pemberian dan mencapai konsentrasi puncak setelah 1 jam, untuk paruh waktu dapat bervariasi antara 2-10 jam (Gemma *et al.*, 2022). Hal ini dapat menyebabkan efek *ACTH4-10* mulai menurun pada jam ke 6 paska kompresi ringan maupun berat. Selain itu respon inflamasi pada tikus berbeda dengan manusia dimana pada manusia inflamasi mulai terjadi setelah 4-6 jam paska trauma dan mencapai puncak nya 24 jam paska trauma (Taoka *et al.*, 1997; Carlson *et al.*, 1998), pada tikus diketahui bahwa respon inflamasi mulai tampak setelah 1 jam paska trauma dan mencapai puncaknya pada jam ke 6 paska trauma (Taoka *et al.*, 1997).

Pada penelitian sebelumnya sudah dibuktikan bahwa pemberian *ACTH4-10* dapat menurunkan ekspresi *IL-1*, *IL-6*, *IL-8*, *TNF- α* pada hewan coba tikus *Sprague-Dawley* (Ardananurdin *et al.*, 2020). Melalui hasil temuan kami pada penelitian ini dimana pada kelompok tikus yang diberikan perlakuan terdapat peningkatan ekspresi *sitokin* anti inflamasi *IL-4*, *IL-6*, *IL-10* dapat membuktikan bahwa *sitokin* anti inflamasi dan pro inflamasi berperan penting dalam regulasi proses inflamasi pada cedera korda spinalis akut.

Meningkatnya *sitokin* anti inflamasi disertai dengan menurunnya *sitokin* pro inflamasi pada hewan model cedera korda spinalis tikus *Sprague-Dawley* setelah pemberian *ACTH4-10* dapat menambahkan penjelasan terhadap temuan sebelumnya dimana pada kelompok tikus yang diberikan *ACTH4-10* didapatkan apoptosis sel yang lebih rendah dari kelompok plasebo (Subagio, 2018). Proses apoptosis diketahui dapat disebabkan oleh mediator-mediator inflamasi dan menjaga keseimbangan proses inflamasi dapat menjadi salah satu target terapi untuk mencegah terjadinya apoptosis (Yang *et al.*, 2015).

6.4 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini juga tidak dilakukan penilaian langsung terhadap konsentrasi farmakokinetik dan dinamik *ACTH4-10* di medulla spinalis sehingga tidak dapat menerangkan dosis optimal yang diperlukan untuk mendapatkan efek terapeutik secara *in vitro* pada trauma kompresi medulla spinalis.

6.5 Temuan Baru

Penelitian ini menghasilkan temuan baru yang belum ditemukan dalam kepustakaan maupun penelitian yang diterbitkan. Hal tersebut meliputi:

1. Ekspresi *IL-4*, *IL-10*, *IL-13* menunjukkan hasil yang lebih tinggi pada pemberian *ACTH4-10Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰* pada hewan coba tikus model *SCI* kompresi akut ringan dan berat dibanding kelompok kontrol dan plasebo.
2. Terdapat perbedaan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, *IL-13* antara pemberian *ACTH4-10Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰* pada hewan coba tikus model cedera kompresi medulla spinalis berat dengan ringan.

3. Terdapat perbedaan ekspresi *IL-4*, *IL-10*, *IL-13* antara pemberian *ACTH4-10Pro⁸-Gly⁹-Pro¹⁰* pada hewan coba tikus model cedera kompresi medula spinalis pada jam ke 3 dan ke 6.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Pada penelitian ini didapatkan:

1. Pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi ringan mielum pada pengamatan jam ke 3 didapatkan peningkatan ekspresi *IL-4*, *IL-10* dan *IL-13*. Pada pengamatan jam ke 6 didapatkan peningkatan ekspresi *IL-10* dan *IL-13*.
2. Pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* pada hewan coba tikus *Sprague dawley* dengan perlakuan cedera kompresi berat mielum pada pengamatan jam ke 3 didapatkan peningkatan ekspresi *IL-10* dan *IL-13*. Pada pengamatan jam ke 6 didapatkan peningkatan ekspresi *IL-4* dan *IL-10*.

Didapatkan peningkatan ekspresi sitokin anti-inflamasi dominan terjadi pada jam ke 3 dibandingkan jam ke 6 pengamatan. Selain itu *IL-10* merupakan sitokin anti inflamasi yang paling signifikan dan konsisten meningkat ekspresinya setelah pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* pada hewan coba tikus *Sprague Dawley* yang dilakukan kompresi ringan maupun berat dan diamati pada jam ke 3 dan jam ke 6.

7.2 Saran

1. Melakukan penelitian lebih lanjut dengan variasi dosis dan waktu pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* untuk mengetahui pengaruhnya terhadap ekspresi sitokin anti-inflamasi pada cedera korda spinalis akut.
2. Melakukan penelitian terhadap ekspresi Malondialdehid dan F2-Isoprostan 15(S)-8-ISO-PGF2a untuk mengetahui apakah ada hubungan pemberian *ACTH(4-10) Pro8-Gly9-Pro10* dengan radikal bebas sebagai penyebab lain dari cedera sekunder pada trauma korda spinalis akut.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, R.U., Alam, M. and Zheng, Y.-P., 2019. Experimental spinal cord injury and behavioral tests in laboratory rats. *Heliyon*, vol. 5, no. 3, p. e01324.
- Anwar, M.A., Shehabi, T.S. Al, Eid, A.H. and Hayley, S., 2016. Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 10, no. April, pp. 1–24.
- Ardananurdin, A., Subagio, E.A. and Utomo, B., 2020. Spinal Cord 's IL-1 , TNF- α and NF- κ B Expression in Sprague-Dawley Rat on Acute Spinal Cord Injury. *International Journal of Molecular Science*, vol. 3, no. 3, pp. 109–114.
- Bertolini, A., 2012. Drug-induced activation of the nervous control of inflammation: A novel possibility for the treatment of hypoxic damage. *European Journal of Pharmacology*, vol. 679, no. 1, pp. 1–8.
- Carlson, S.L., Parrish, M.E., Springer, J.E., Doty, K. and Dossett, L., 1998. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Experimental neurology*, vol. 151, no. 1, pp. 77–88.
- Cavaillon, J.M., 2001. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, vol. 47, no. 4, pp. 695–702.
- Colaterais, E., Uso, D.O., Em, D.E.E., Com, P. and Medular, L., 2015. Side Effects of Steroid Use in Patients With Traumatic Spinal Cord Injury. *Columna*, vol. 14, no. 1, pp. 45–49.
- Dinareello, C.A., 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest*, vol. 118, no. 2, pp. 503–508.
- Dolotov, O. V, Zolotarev, Y.A., Dorokhova, E.M., Andreeva, L.A., Alfeeva, L.Y., Grivennikov, I.A. and Myasoedov, N.F., 2004. The Binding of Semax , ACTH 4 – 10 Heptapeptide , to Plasma Membranes of the Rat Forebrain Basal Nuclei and Its Biodegradation. *Neuroscience and Medicine*, vol. 30, no. 3, pp. 213–217.
- Dumont, R.J., Okonkwo, D.O., Verma, S., Hurlbert, R.J., Boulos, P.T., Ellegala, D.B. and Dumont, a S., 2001. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clinical neuropharmacology*, vol. 24, no. 5, pp. 254–64.
- Faris, M., Utomo, B., Fauzi, A. Al, Sudiana, I.K., Maliawan, S., Dahlan, Y.P., Illiandri, O., Machfoed, M.H. and Bajamal, A.H., 2021. ACTH₄₋₁₀PRO⁸-GLY⁹-PRO¹⁰ improves Neutrophil profile in spinal cord injury of rat models . *Journal Of Advanced Pharmacy Education And Research*, vol. 11, no. 2, pp. 61–65.
- Fehlings, M.G., Vaccaro, A.R., Boakye, M., Rossignol, S., John F. Ditunno, J. and Burns, A.S., 2012. *Essentials of Spinal Cord Injury*,.
- Fenton, M.J., Buras, J.A. and Donnelly, R.P., 1992. IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 149, no. 4, pp. 1283–1288.
- Fleming, J.C., Norenberg, M.D., Ramsay, D.A., Dekaban, G.A., Marcillo, A.E., Saenz, A.D., Pasquale-Styles, M., Dietrich, W.D. and Weaver, L.C., 2006.

- The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain : a journal of neurology*, vol. 129, no. Pt 12, pp. 3249–3269.
- Gemma, M., Maliawan, D., Subagio, E.A. and Utomo, B., 2022. neurotrophin-3 expression in Sprague Dawley rat on acute spinal cord injury. *Bali Medical Journal*, vol. 11, no. 1, pp. 18–22.
- Glutton, S., 1997. The importance of oxidative stress in apoptosis. *British Medical Buletin*, vol. 33, no. 3, pp. 662–668.
- Goerdts, S., Politz, O., Schledzewski, K., Birk, R., Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Klemke, C.D., Dippel, E., Kodelja, V. and Orfanos, C.E., 1999. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, vol. 67, no. 5–6, pp. 222–226.
- Haanen, C. and Vermes, I., 1995. Apoptosis and. *Mediators of Inflammation*, vol. 4, pp. 5–15.
- IACUC. 2018. <https://animal.research.uiowa.edu/iacuc-guidelines-anesthesia>. Diakses pada 27 Desember 2019.
- Iyer, S.S. and Cheng, G., 2012. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical reviews in immunology*, vol. 32, no. 1, pp. 23–63.
- Kirshblum, S.C., Waring, W., Biering-Sorensen, F., Burns, S.P., Johansen, M., Schmidt-Read, M., Donovan, W., Graves, D.E., Jha, A., Jones, L., Mulcahey, M.J. and Krassioukov, A., 2011. Reference for the 2011 revision of the international standards for neurological classification of spinal cord injury. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, vol. 34, no. 6, pp. 547–554.
- Kolomin, T., Shadrina, M., Slominsky, P., Limborska, S. and Myasoedov, N., 2013. A New Generation of Drugs: Synthetic Peptides Based on Natural Regulatory Peptides. *Neuroscience & Medicine*, vol. 04, no. 04, pp. 223–252.
- Li-Weber, M. and Krammer, P.H., 2003. Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. *Nature Reviews Immunology*, vol. 3, no. 7, pp. 534–543.
- Lim, P.A. and Tow, A.M., 2007. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. *Ann Acad Med Singapore*, vol. 36, no. 0304-4602 (Print), pp. 49–57.
- Mantovani, A., Sica, A. and Locati, M., 2007. New vistas on macrophage differentiation and activation. *European journal of immunology*, vol. 37, no. 1, pp. 14–16.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. and Locati, M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, vol. 25, no. 12, pp. 677–686.
- Medvedeva, E. V., Dmitrieva, V.G., Povarova, O. V., Limborska, S.A., Skvortsova, V.I., Myasoedov, N.F. and Dergunova, L. V., 2014. The peptide semax affects the expression of genes related to the immune and vascular systems in rat brain focal ischemia: genome-wide transcriptional analysis. *BMC genomics*, vol. 15, p. 228.
- Murray, P.J. and Wynn, T.A., 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews. Immunology*, vol. 11, no. 11, pp. 723–737.
- Ochoa-Repáraz, J., Rynda, A., Ascón, M.A., Yang, X., Kochetkova, I., Riccardi,

- C., Callis, G., Trunkle, T. and Pascual, D.W., 2008. IL-13 production by regulatory T cells protects against experimental autoimmune encephalomyelitis independently of autoantigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 181, no. 2, pp. 954–968.
- Offner, H., Subramanian, S., Wang, C., Afentoulis, M., Vandenbark, A.A., Huan, J. and Burrows, G.G., 2005. Treatment of passive experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice with a recombinant TCR ligand induces IL-13 and prevents axonal injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 175, no. 6, pp. 4103–4111.
- Oldfield, E.H., Magistretti, P., Leroux, P.D. and Couldwell, W.T., *Youman Neurological Surgery 6th Edition*.
- Opal, S.M. and DePalo, V.A., 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, vol. 117, no. 4, pp. 1162–1172.
- Orr, M.B. and Gensel, J.C., 2018. Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, vol. 15, no. 3, pp. 541–553.
- Patel, H.B., Montero-Melendez, T., Greco, K. V and Perretti, M., 2011. Melanocortin receptors as novel effectors of macrophage responses in inflammation. *Frontiers in immunology*, vol. 2, p. 41.
- Poon, P.C., Gupta, D., Shoichet, M.S. and Tator, C.H., 2007. Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates. *Spine*, vol. 32, no. 25, pp. 2853–2859.
- Sica, A. and Mantovani, A., 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*, vol. 122, no. 3, pp. 787–795.
- Sim, A.S., Patellongi, I., Yusuf, I., As'ad, S., Wahid, S., Aulina, S., Kabo, P., Sajuthi, D. and Islam, A.A., 2017. The Effect of ACTH 4-10 ProGlyPro as Anti-inflammatory on Astrocyte Cell Repair in Spinal-Cord-Injured Mouse by Assessing Locomotor Function. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*, vol. 33, pp. 31–41.
- Subagio EA, 2011. Mekanisme Penurunan Jumlah Sel Apoptosis Melalui Peningkatan Rasio Bcl-2/ HSP 70 Oleh ACTH4-10 Pro8-Gly9-Pro10 Pada Cedera Kompresi Korda Spinalis Akut. Available at: <http://repository.unair.ac.id/id/eprint/71183>
- Taoka, Y., Okajima, K., Uchiba, M., Murakami, K., Kushimoto, S., Johnno, M., Naruo, M., Okabe, H. and Takatsuki, K., 1997. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, vol. 79, no. 4, pp. 1177–1182.
- Tulaar, A.B.M., Karyana, M., Karunia Wahyuni, L., Paulus, A.F.S., Tinduh, D., Anetherita, F. and Wangge, G., 2017. People with Spinal Cord Injury in Indonesia. *American journal of physical medicine & rehabilitation*, vol. 96, no. 2 Suppl 1, pp. S74–S77.
- de Vries, J.E., 1998. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *The Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 102, no. 2, pp. 165–169.
- Wang, W., Guo, D., Lin, Y. and Tao, Y., 2019. Melanocortin Regulation of Inflammation. *Frontiers in Endocrinology*, 10, pp.683
- Widhiyanto, L., Martiana, I., Airlangga, P.A. and Permana, D., 2019. Studi Epidemiologi Fraktur Vertebra di RSUD Dr.Soetomo Surabaya Pada Tahun

- 2013-2017. Qanun Medika, Jurnal Kedokteran, 3 (1).
- Yang, Y., Jiang, G., Zhang, P. and Fan, J., 2015. Programmed cell death and its role in inflammation. *Military Medical Research*, vol. 2, no. 1, p. 12.
- Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.-J., Wu, Y.-P. and Chen, W.-S., 2012. Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *The Indian Journal of Medical Research*, vol. 135, no. 3, pp. 287–296.