

KARYA TULIS ILMIAH

**PERAN EKSTRAK KOMBINASI PEGAGAN, KAYU MANIS, DAN
SPIRULINA DALAM MENINGKATKAN NEUROGENESIS PADA OTAK
TIKUS DENGAN CEDERA OTAK TRAUMATIS FASE KRONIS**

Diajukan sebagai Syarat Meraih Gelar Sarjana pada Fakultas Kedokteran

Universitas Mataram



Oleh:

Amrullah Muliawan. H

NIM: H1A020009

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS MATARAM**

2023

ABSTRAK

PERAN EKSTRAK KOMBINASI PEGAGAN, KAYU MANIS, DAN SPIRULINA DALAM MENINGKATKAN NEUROGENESIS PADA OTAK TIKUS DENGAN CEDERA OTAK TRAUMATIS FASE KRONIS

Amrullah Muliawan H, Bambang Priyanto, Lale Maulin Prihatina

Latar Belakang: Cedera otak traumatis (COT) merupakan kerusakan sementara atau permanen pada otak yang diakibatkan oleh adanya tekanan mekanik eksternal yang mengenai kranium dan komponen intrakranium. Setelah terjadi COT akan terjadi proses neurogenesis untuk menggantikan sel-sel otak yang rusak. Penelitian ini menguji ekstrak kombinasi pegagan, kayu manis, dan spirulina dalam meningkatkan neurogenesis pada otak tikus dengan cedera otak traumatis menggunakan marker neuronal-neuclei (NeuN). **Metode** Penelitian ini merupakan penelitian analitik experimental. Subjek penelitian adalah tikus Sprague Dawley laki-laki berumur 10-12 minggu dengan berat 250-300 gram. Pemodelan cedera otak traumatis pada tikus menggunakan tehnik marmarou. Tikus dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok tikus yang diberikan ekstrak kombinasi (N:6) dan kelompok tikus yang diberikan placebo (N:6). Setelah 21 hari perlakuan, otak tikus diambil kemudian dinilai persentase neurogenesisnya dengan pemeriksaan Immunohistochemistry (IHC) menggunakan marker antibodi NeuN. Analisis data menggunakan software SPSS. **Hasil:** Tidak didapatkan peningkatan neurogenesis pada kelompok perlakuan dibandingkan placebo dengan nilai $P > 0,05$ (0,946). **Simpulan:** Ekstrak kombinasi pegagan, kayu manis, dan spirulina tidak dapat meningkatkan neurogenesis pada otak tikus dengan cedera otak traumatis fase kronis. **Kata Kunci:** *Traumatic brain injury*, Cedera otak traumatis, Neurogenesis, NeuN, Pegagan, kayu manis, Spirulina

ABSTRACT

THE ROLE OF THE COMBINED EXTRACT OF GOTU COLA, CINNAMON, AND SPIRULINA IN IMPROVING NEUROGENESIS IN THE BRAIN OF RATS WITH CHRONIC PHASE TRAUMATIC BRAIN INJURY

Amrullah Muliawan H, Bambang Priyanto, Lale Maulin Prihatina

Background: Traumatic brain injury (TBI) is temporary or permanent damage to the brain caused by external mechanical pressure affecting the cranium and intracranial components. After TBI, a neurogenesis process will occur to replace damaged brain cells. This study tested a combination extract of gotu kola, cinnamon, and spirulina in increasing neurogenesis in the brains of mice with traumatic brain injury using the neuronal-nuclei (NeuN) marker. This research method is experimental analytical research. The subjects of this research were male Sprague Dawley rats aged 10-12 weeks, weighing 250-300 grams. **Modeling:** Traumatic brain injury in mice using the marmarou technique. The mice were divided into 2 groups, namely the group of mice given the combination extract (N: 6) and the group of mice given placebo (N: 6). After 21 days of treatment, the brains of the mice were taken and then assessed for the percentage of neurogenesis using immunohistochemistry (IHC) examination using the NeuN antibody marker. Data analysis using SPSS software. **Results:** There was no increase in neurogenesis in the treatment group compared to placebo with a P value > 0.05 (0.946). **Conclusion:** The combination extract of gotu kola, cinnamon and spirulina could not increase neurogenesis in the brains of mice with chronic phase traumatic brain injury. **Keywords:** Traumatic brain injury, Cedera otak traumatis, Neurogenesis, NeuN, Gotu Kola, cinnamon, Spirulina

PENDAHULUAN

Menurut *Brain Injury Assosiation of America* cedera otak ialah kerusakan pada otak akibat serangan atau benturan fisik dari luar, bukan bersifat degeneratif ataupun kongenital. Cedera otak traumatis atau *Traumatic Brain Injury (TBI)* merupakan kerusakan sementara atau permanen pada otak yang diakibatkan oleh adanya tekanan mekanik eksternal yang mengenai kranium dan komponen intrakranium (Tahir S, 2011). Pada cedera otak traumatis (COT) akan mengakibatkan kerusakan kompleks yaitu luka tertutup ataupun terbuka yang menembus kulit dan melibatkan struktur lapisan kepala mulai dari lapisan paling luar, yaitu kulit sampai dengan tulang tengkorak, vaskular otak, ataupun jaringan otak sebagai cedera kranio-serebral (Suharto *et al.*, 2019). Pasien yang selamat dari cedera otak traumatis dapat mengalami gangguan neurologis termasuk gangguan kognitif, perilaku maupun emosi tergantung derajat keparahan cedera otak yang dialami (Pramana Suarjaya *et al.*, 2012). Cedera otak traumatis adalah masalah kesehatan serius yang berdampak pada sosial ekonomi secara global. Cedera otak traumatis merupakan penyebab utama dari kematian, terutama pada remaja dan mengakibatkan disabilitas seumur hidup bagi yang sembuh. Sekitar 30-40 % orang yang sembuh akan mengalami depresi (Roozenbeek *et al.*, 2013).

Di Amerika antara tahun 1997 hingga tahun 2007 rata-rata kunjungan ke unit gawat darurat yang diakibatkan oleh cedera otak traumatis mencapai 1.365.000 per tahun. Sebanyak 275.000 diantaranya memerlukan perawatan inap di rumah sakit. Angka kematian rata-rata yang diakibatkan cedera otak traumatik mencapai 52.000 orang atau sekitar 18,4 orang tiap 100.000 populasi (Coronado *et al.*, 2011). Pada tahun 2013 jumlah tersebut makin meningkat, sekitar 2.8 juta kunjungan ke unit gawat darurat yang diakibatkan oleh cedera otak traumatik. Sebanyak 282.000 diantaranya memerlukan perawatan inap, dan sekitar 56.000 mengalami kematian. Mekanisme cedera otak traumatis yang paling sering untuk semua kelompok umur adalah terjatuh, dipukul oleh atau terhadap suatu objek, dan kecelakaan kendaraan bermotor (Taylor *et al.*, 2017).

Di Indonesia pada tahun 2018, prevalensi cedera otak traumatis (COT) yaitu 11,9% dan merupakan kasus ketiga terbanyak setelah cedera pada anggota gerak bawah dan anggota gerak atas dengan prevalensi masing-masing 67,9 % dan 32,7% (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2019). Instalasi Gawat Darurat di RSUD Ulin Banjarmasin tahun 2014 melaporkan bahwa COT termasuk 10 besar penyakit terbanyak bedah dengan angka 1.187 kasus dari 4.406 kasus dengan kasus COT ringan sebanyak 767 kasus (64%), kemudian COT sedang 198 kasus (16,7%), dan COT berat (222 Kasus) (Suharto *et al.*, 2019). Angka kematian pada laki-laki tercatat tiga kali lebih tinggi dibandingkan angka kematian pada perempuan, hal ini diakibatkan oleh laki-laki dominan melakukan aktivitas beresiko tinggi, resiko kerja, olahraga dan cedera akibat kekerasan (Coronado *et al.*, 2011). Diperkirakan bahwa cedera otak traumatik akan menjadi peringkat ke-tiga terbesar dari total beban penyakit secara global pada tahun 2020 (Tahir S, 2011).

Cedera otak traumatis (COT) dapat diklasifikasikan menjadi COT Primer dan COT Sekunder. COT Primer merupakan akibat langsung yang diakibatkan oleh benturan yang mengakibatkan kerusakan anatomis maupun fisiologis. Cedera otak sekunder adalah akibat dari hipotensi, hipoksia, asidosis, edema, atau faktor lanjut lain yang menyebabkan kerusakan jaringan otak. Radikal bebas pada saat iskemia juga dapat menyebabkan kerusakan sekunder pada otak (Sudadi, 2017). Pada stress oksidatif terjadi peningkatan spesies oksigen reaktif (radikal bebas oksigen dan entitas terkait termasuk superoksida, hidrogen peroksida, oksida nitrat, dan peroksinitrit) sebagai respons terhadap cedera otak traumatik. Produksi berlebihan spesies oksigen reaktif karena eksitotoksisitas dan kelelahan menginduksi proses peroksidasi dari struktur seluler dan pembuluh darah, oksidasi protein, pembelahan DNA, dan penghambatan rantai transportasi elektron mitokondria. Stress oksidatif berkontribusi pada kematian sel secara langsung dan memicu terjadinya proses inflamasi, apoptosis dan nekrosis (Werner & Engelhard, 2007).

Cedera otak traumatis berdasarkan waktu terjadinya trauma terbagi menjadi 3 yaitu fase akut, fase subakut dan fase kronis. Fase akut merupakan cedera otak yang timbul segera setelah trauma hingga 3 hari, fase subakut yaitu cedera otak yang terjadi sejak 3 hari sampai 14 hari dan fase kronis berlangsung lebih dari 14 hari. Pada cedera otak traumatik, perdarahan akut terjadi kurang dari 3 hari dari kejadian dan dari gambaran CT scan didapatkan lesi hiperdens dibandingkan dengan otak. Fase subakut dimulai 3-7 hari setelah cedera akut atau sumber lain menyebutkan usia perdarahan lebih dari 3 hari sampai kurang dari 3 minggu. Perdarahan kronis berkembang lebih dari sama dengan 3 minggu paska trauma dan pada gambaran CT scan didapatkan lesi hipodens dibandingkan dengan otak (Rohadi, 2021).

Neurogenesis atau proliferasi sel adalah proses penting dalam pembentukan sel saraf, dimana sel saraf bermigrasi, dewasa dan terintegrasi hingga membentuk sel saraf baru. Proses neurogenesis berawal dari proliferasi sel kemudian bermigrasi dan berubah membentuk sel baru di hippocampus. Proses ini diperkirakan memakan waktu sekitar 4 minggu (Rosyidi *et al.*, 2020). Intervensi cedera otak traumatis klinis mencakup serangkaian tindakan yang diperlukan secara medis dan menyelamatkan nyawa, termasuk pembedahan, anestesi, dan pengobatan dengan obat neuroaktif untuk meningkatkan perawatan dan pemulihan. Mengingat sensitivitas yang luar biasa dari progenitor sel granula dan sel granula yang belum matang terhadap perubahan lingkungan sekitarnya, obat-obatan ini memiliki potensi untuk memberikan efek positif dan negatif pada neurogenesis (Ngwenya & Danzer, 2019).

Protein *Neuronal nuclei* (NeuN) terletak di nukleus dan sitoplasma perinukleus pada sebagian besar saraf di sistem saraf pusat mamalia. Monoklonal antibodi protein NeuN sudah banyak digunakan lebih dari 20 tahun pada penelitian immunohistokimia tentang difrensiasi sel saraf pada keadaan normal atau patologis (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015). Protein NeuN merupakan keluarga protein RNA-binding Fox (Rbfox) dan seluruh keluarga protein mengatur penyambungan RNA alternatif. NeuN secara eksklusif dihasilkan dalam

neuron dan disfungsional NeuN dapat ditemukan pada berbagai gangguan otak manusia seperti epilepsi, autisme, keterlambatan perkembangan saraf, dan gangguan kognitif. NeuN juga berperan dalam regulasi neurogenesis dan sinaptogenesis (Lin *et al.*, 2016). Ekspresi NeuN dapat diamati pada sebagian besar tipe sel saraf di seluruh sistem saraf tikus dewasa (Mullen *et al.*, 1992).

Ekstrak kombinasi kayu manis, pegagan dan spirulina memiliki potensi dalam pengobatan cedera otak traumatis. Kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum*) merupakan salah satu rempah yang banyak digunakan di berbagai negara. Tanaman ini termasuk jenis tanaman tropis yang dapat ditemukan di India, Srilangka, Madagascar dan negara-negara Indocina. Kayu manis sering digunakan di berbagai belahan dunia sebagai obat tradisional terkait peradangan dan stress oksidatif, namun kaitannya dengan pengobatan untuk cedera otak traumatis belum dibuktikan secara klinis (Yulug *et al.*, 2018). Akan tetapi pada penelitian Mirmosayyeb *et al.*, 2017 kayu manis memiliki potensi sebagai obat terapi pada gangguan syaraf yang berkaitan dengan peradangan syaraf dan stress oksidatif seperti pada penyakit alzheimer disease. Pegagan (*Centella asiatica*) adalah obat sejak zaman prasejarah dan biasa digunakan sebagai sayuran oleh masyarakat. Tanaman ini telah digunakan dalam pengobatan Ayurveda, Unani dan obat tradisional di India, Srilangka, dan Negara-negara Asia Tenggara selama berabad-abad. Pegagan memiliki efek imunomodulator, anti-inflamasi, radioprotektif, anti-depresan dan neuroprotektor sehingga pegagan banyak digunakan sebagai obat hingga saat ini (Irsalina, 2020). Spirulina adalah alga biru yang sudah digunakan oleh bangsa Aztec sejak ribuan tahun yang lalu sebagai sumber makanan dan dikenal banyak mengandung β -carotene dan beberapa Phycocyanin yang berperan sebagai antioksidan, antiinflamasi dan neuroprotektif (Garbuzova-davis *et al.*, 2010). Dengan beberapa manfaat ekstrak kombinasi yang sudah disebutkan tadi diharapkan mampu meningkatkan neurogenesis melalui mekanisme peningkatan regenerasi neurit dan penurunan faktor penghambat neurogenesis seperti peradangan, edema dan nekrosis. Neuronal-nuclei (NeuN) yang terletak di inti sel saraf yang sudah mature akan menjadi penanda jumlah sel saraf pada otak tikus.

Cedera otak traumatis (COT) sangat mengancam jiwa sehingga harus mendapatkan penanganan serta pengobatan yang tepat agar pasien tidak mengalami kecacatan yang parah bahkan kematian. Beberapa penelitian mengemukakan bahwa tanaman pegagan, kayu manis dan spirulina masing-masing memiliki efek positif pada penyembuhan cedera otak. Oleh karena itu, pada penelitian ini peneliti tertarik menggabungkan ketiga bahan tersebut sehingga melakukan penelitian dengan judul “Peran Ekstrak Kombinasi Pegagan, Kayu Manis dan Spirulina dalam Meningkatkan Neurogenesis pada Otak Tikus dengan Cedera Otak Traumatis Fase Kronis”.

METODE

Desain penelitian ini adalah analitik ekperimental yang dilakukan dengan cara memberikan cedera otak traumatis pada tikus menggunakan tehnik marmarou model, kemudian tikus dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok perlakuan diberikan ekstrak kombinasi pegagan, kayu manis, dan spirulina, sementara itu kelompok placebo diberikan placebo. Tikus diberikan perlakuan selama 21 hari kemudian dilakukan pengamatan histologi pada otak tikus untuk menilai neurogenesis pada otak tikus. Pada penelitian ini menggunakan 12 ekor tikus Sprague-Dawley yang berumur 10-12 minggu dengan berat badan 250-300 gram, diberikan makanan standar (Comfeed AD-2) dan air. Tikus dibagi menjadi dua kelompok yaitu tikus cedera otak traumatis dengan pemberian ekstrak kombinasi dan tikus cedera otak traumatis dengan pemberian placebo.

Prosedur Kerja Penelitian

a. Pemeliharaan tikus Sprague-Dawley

Dua belas ekor tikus Sprague-Dawley, (umur 10-12 minggu, berat badan 200-300 g) dibeli dan dipelihara di Laboratorium Farmakologi FK Unram. Tikus Sprague-Dawley ditempatkan secara berkelompok (5-6 ekor per kandang) pada kandang dengan suhu ruangan $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Penerangan diatur dengan siklus 12 jam terang dan 12 jam gelap (Siklus terang dimulai pukul 06.00 sampai pukul 18.00 pm). Tikus diadaptasi selama 7 hari agar melakukan penyesuaian dengan lingkungan yang baru serta mendapatkan makanan standar (Comfeed AD-2) dan air. Tikus yang sakit atau mati akan dikeluarkan dari penelitian. Selama pelaksanaan penelitian, tikus diperlakukan dengan hati-hati dan memperhatikan kelayakan etik penelitian dengan hewan coba.

b. Model cedera otak traumatik

Model trauma yang dilakukan adalah The Modified Marmarou Model dengan menggunakan beban 20 g yang kemudian dijatuhkan dari ketinggian 20 cm, melalui sebuah tabung. Tikus sebelumnya dianestesi

dengan menggunakan ketamin yang diencerkan (10 mg/kgBB) kemudian bulu kepala dicukur dan dibersihkan dengan alkohol 70%. Selanjutnya, dilakukan insisi untuk membuka kulit kepala.

c. Pembedahan tikus

Pembedahan tikus dilakukan dengan memberikan anestesi terlebih dahulu. Setelah tikus dipastikan tidak sadar (tidak menunjukkan gerakan spontan). Pembedahan otak dilakukan dengan sayatan korona di sepanjang garis tengah kepala dan kemudian membuat lubang duri di mana sebuah lubang dibor atau dikerok ke dalam tengkorak tikus, sampai dura mater terbuka. Bagian dura mater yang telah dibuka diletakkan di bawah tabung, sehingga beban jatuh tepat pada dura mater dan dipastikan bahwa trauma tersebut telah menyebabkan kerusakan otak.

d. Perawatan pasca pembedahan

Setelah prosedur pembedahan, luka kemudian dijahit dan dioleskan salep antibiotik. Semua prosedur pembedahan dilakukan secara aseptik dengan prinsip steril. Setelah prosedur, semua tikus dirawat pada suhu kamar dalam kandang standar untuk pemulihan. Pasca hari ke-21 perlakuan, tikus dieutanasia dengan menggunakan ketamin 20 mg/kgBB diinjeksikan intrakardial, kemudian dilakukan ekstraksi jaringan otak dengan cara craniotomy. Jaringan otak segera dimasukkan ke cup berisi formalin, sampai diproses lebih lanjut melalui pemeriksaan imuno-histokimia dengan menggunakan marker NeuN.

e. Pengambilan sampel dan pengujian

Sampel jaringan otak diambil setelah perlakuan selama 21 hari, kemudian diwarnai menggunakan metode pewarnaan parafin dan hematoksilin eosin (HE) dan diuji secara imunohistokimia menggunakan marker NeuN.

Prosedur penelitian

- 1) Pembiusan umum kepada tikus
- 2) Dilakukan pencukuran rambut dan tindakan aseptik pada bagian parietal menggunakan betadine.
- 3) Craniotomi 1 mm kearah posterior dan 2 mm kearah lateral dari bregma
- 4) Pemberian beban trauma kepada tikus dengan model Marmarou yang dimodifikasi sehingga menjatuhkan besi berbentuk bola sesuai dengan berat yang ditentukan. Bola jatuh dengan ketinggian 20 cm langsung melalui guiding tube pada permukaan duramater tikus yang telah terlihat.
- 5) Setelah prosedur pembedahan, lapisan otot dan kulit dijahit lapis demi lapis dan bekas luka insisi dioles dengan antibiotik bactrasin-zinc.
- 6) Pada 30 menit setelah cedera otak, masing-masing kelompok diberikan ekstrak kombinasi dan placebo diberikan per sonde dengan dosis 1 ml/200g bb tikus per hari sampai penghentian pada hari ke-21
- 7) Pada hari ke-22 dilakukan terminasi dengan injeksi melalui intrakardial 20 mg/kgBB ketamin, kemudian dilakukan ekstraksi otak secara kraniotomi dan pembuatan blok parafin. Tikus yang telah dilakukan ekstraksi otak akan dikuburkan di tanah
- 8) Memotong blok parafin dengan ketebalan 4-6 mikron menjadi preparat.
- 9) Preparat diberikan pewarnaan H&E dan diuji secara imunohistokimia menggunakan Marker NeuN.
- 10) Lalu dilakukan pengamatan preparat dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x

HASIL DAN PEMBAHASAN.

Hasil Penelitian

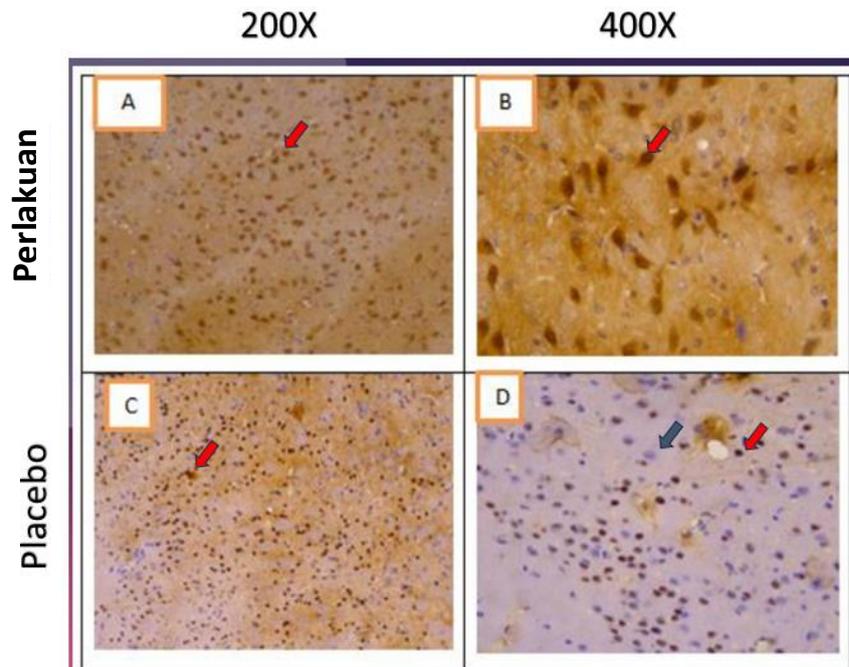
Subjek pada penelitian ini adalah tikus Sprague-Dawley yang memenuhi kriteria penelitian yang sudah ditentukan. Penelitian dilakukan selama 21 hari pada tanggal 25 April-9 Mei 2023 dengan jumlah sampel 12 ekor tikus. Data yang digunakan merupakan data primer yang diambil secara langsung dengan melakukan percobaan. Sampel tikus dibagi menjadi 2 kelompok yakni 6 tikus diberikan perlakuan, namun saat berlangsungnya penelitian, 1 tikus perlakuan mati pada hari ke-19 sehingga sampel yang didapatkan hanya 5 tikus perlakuan, kemudian terdapat 6 sampel tikus placebo.

Gambaran persentase neurogenesis dinilai dari sediaan jaringan yang diamati menggunakan mikroskop pada setiap lapang pandang menggunakan perbesaran 400x dan dilakukan pengukuran persentase neurogenesis pada semua kelompok sampel.

Tabel 5.1 Hasil Pembacaan Histopatologi Neurogenesis Sel Otak Tikus

Jenis Sampel	Kode Tikus	Persentase NeuN (%)
Perlakuan	PK 1	40
	PK 2	50
	PK 3	60
	PK 4	40
	PK 5	50
Placebo	PC 1	50
	PC 2	50
	PC 3	60
	PC 4	50
	PC 5	40
	PC 6	40

Berdasarkan tabel 5.1 tidak didapatkan perbedaan rata-rata persentase neurogenesis pada kedua jenis sampel. Pada kelompok perlakuan rata-rata persentase neurogenesis sebesar 48 %. Sementara itu pada kelompok placebo didapatkan rata-rata persentase neurogenesis sebesar 48,33 %.



Gambar 5.1 Gambaran pulasan IHC NeuN pada Sel Otak Tikus Pasca Cedera Otak Traumatis Fase Kronis. (A) Perlakuan 200x, (B) Perlakuan 400x, (C) Placebo 200x, (D) Placebo 400x. Panah merah menunjukkan sel NeuN positif dan panah biru NeuN negatif.

Pada gambar 5.1 sel IHC NueN positif berwarna coklat yang mewarnai inti dari sel saraf, semnetara itu sel yang berwarna biru merupakan sel yang tidak positif NeuN. Gambar IHC NeuN (PK 2) dijadikan sebagai gambar representasi IHC NeuN pada kelompok otak tikus perlakuan dengan persentase neurogenesis 50%. Sementara itu gambar IHC NeuN (PC 2) dijadikan sebagai gambar representasi IHC NeuN pada kelompok otak tikus placebo dengan persentasi 50%.

Pembahasan

Hasil penelitian ini berdasarkan gambaran histopatologi persentase NeuN otak tikus tidak didapatkan hasil tidak bermakna sehingga h1 ditolak dan h0 diterima. Hal ini membuktikan bahwa pemberian obat kombinasi kayu manis, pegagan dan spirulina tidak dapat meningkatkan neurogenesis pada otak tikus dengan cedera otak traumatis fase kronis.

Berdasarkan literatur yang ada, ekstrak kombinasi Pegagan, Kayu Manis dan Spirulina dapat berpotensi sebagai terapi efektif pada pengobatan cedera otak traumatis. Asam asiatika yang terkandung dalam pegagan adalah bagian dari triterpenoid yang berfungsi menguatkan sel-sel kulit dan meningkatkan perbaikannya, menstimulasi sel darah dan sistem imun, dan sebagai antibiotik alami. Brahmosida pada pegagan berfungsi memperlancar aliran darah dan merupakan protein penting bagi sel otak (Sutardi, 2016). Didapatkan juga pada penelitian (Luo *et al.*, 2014) bahwa kandungan madekosida pada pegagan mengurangi area infark otak, mengatasi defisit neurologis, dan memperbaiki apoptosis neuron. Sebuah penelitian lain yang meneliti efek ekstrak air dan etanol dari pegagan pada regenerasi saraf menunjukkan bahwa ekstrak etanol meningkatkan pertumbuhan neurit yang signifikan pada sel SH-SY5Y manusia di hadapan faktor pertumbuhan saraf (Soumyanath *et al.*, 2010). Kayu manis kaya akan antioksidan berupa cinnamaldehyde yang dapat memblokir reaksi oksidatif sehingga menghalangi terjadinya apoptosis neuron (Hidayat *et al.*, 2021). Kemudian spirulina banyak mengandung phycocyanin yang berperan sebagai antioxidant, antiinflamasi dan neuroprotektif (Garbuzova-davis *et al.*, 2010).

Akan tetapi pada penelitian ini tidak didapatkan peningkatan neurogenesis dengan pemberian obat kombinasi. Terdapat beberapa faktor yang menyebabkan hasil tidak signifikan. Faktor pertama ialah penentuan dosis yang spekulatif dan tidak ada serial dose sehingga dosis yang diberikan kemungkinan belum efektif. Pada penelitian ini konsentrasi ekstrak obat kombinasi pegagan, kayu manis dan

spirulina adalah 70, 2 mg/ml (pegagan (23,4 mg/ml), kayu manis (23,4 mg/ml) dan spirulina (24,4 mg/ml)).

Pemberian obat kombinasi dilakukan dengan satu dosis yaitu 1 ml/ 200 g bb tikus sehingga dalam 1x pemberian terdapat 351 mg/kg bb obat kombinasi. Sehingga dapat disimpulkan dalam sekali pemberian terdapat pegagan (117 mg/kgbb), kayu manis (117 mg/kgbb), dan spirulina (117 mg/kgbb). Kandungan ekstrak obat yang kurang dan hanya terdapat satu macam dosis pemberian obat kombinasi mengakibatkan hasil neurogenesis tidak signifikan.

Sejalan dengan itu pada penelitian yang dilakukan oleh (Thaakur & Sravanthi, 2010) dimana pemberian ekstrak spirulina kepada tikus dibagi menjadi 3 kelompok (40, 90, 180 mg/kg.po). Pada penelitian tersebut tikus yang diberikan ekstrak Spirulina dengan dosis 180 mg/kg secara signifikan mengurangi kadar malondialdehid (MDA) dan memulihkan aktivitas penurunan superoksida dismutase otak (SOD), katalase (CAT), dan glutathione tereduksi (GSH) yang menunjukkan bahwa Spirulina memiliki potensi perlindungan terhadap cedera iskemia serebral. Pada penelitian lain yang dilakukan oleh (Soumyanath et al., 2010) dosis pemberian ekstrak pegagan (*Centella Asiatica*) lebih tinggi yaitu 300 mg/kg per oral. Didapatkan hasil bahwa terjadi pemulihan fungsional yang lebih cepat dan peningkatan regenerasi aksonal (akson kaliber lebih besar dan jumlah akson bermielin yang lebih banyak) dibandingkan dengan kontrol, menunjukkan bahwa akson tumbuh lebih cepat.

Faktor kedua yang membuat hasil kurang signifikan adalah penggunaan marker NeuN. Berdasarkan literatur yang ada, belum pernah dilakukan penelitian serupa menggunakan marker NeuN. NeuN tidak mewarnai inti sel saraf yang belum matur sampai mereka menyelesaikannya perkembangannya (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015). Proses neurogenesis berawal dari proliferasi sel kemudian bermigrasi dan berubah membentuk sel baru di hippocampus. Proses diperkirakan memakan waktu sekitar 28 hari (Emsley *et al.*, 2005).

Cedera otak traumatis berdasarkan waktu terjadinya trauma terbagi menjadi 3 yaitu fase akut, fase subakut dan fase kronis. Fase akut merupakan cedera otak yang timbul segera setelah trauma hingga 3 hari, fase subakut yaitu cedera otak yang terjadi sejak 3 hari sampai 14 hari dan fase kronis berlangsung lebih dari 14 hari (Rohadi, 2021). Pada penelitian ini lama perlakuan sekitar 21 hari sebagai representasi cedera otak traumatis fase kronis. Namun pada hari ke-21 sel-sel saraf yang baru terbentuk diduga belum mature mengakibatkan pewarnaan NeuN tidak maksimal. Pada penelitian sebelumnya yang serupa dilakukan oleh (Rosyidi *et al.*, 2020) marker yang digunakan untuk menilai neurogenesis pada tikus spargue-dawley adalah synaptosin. Pada penelitian tersebut memakan waktu 6 minggu perlakuan sebelum dilakukan terminasi.

Penggunaan marker NeuN juga berpotensi terjadi *false* negatif. Pada penelitian yang dilakukan oleh (Ünal-Çevik *et al.*, 2004) mengungkapkan bahwa gambaran penurunan ekspresi antibodi NeuN tidak selalu mengindikasikan kehilangan sel syaraf, namun penurunan pewarnaan NeuN juga dapat disebabkan oleh berkurangnya protein atau hilangnya antigenisitasnya akibat cedera otak iskemik.

Faktor ketiga adalah faktor stres pada tikus. Stres adalah respon yang tidak spesifik dari tubuh terhadap tuntutan yang diterima. Stres sendiri dapat juga dialami pada hewan tak terkecuali pada tikus. Faktor lingkungan merupakan faktor pemicu tikus dapat mengalami stres. Faktor lingkungan tersebut dapat berupa kapasitas kandang dan persaingan sesama tikus (Soeharto, 2004).

Pada penelitian ini terdapat 1 tikus perlakuan mati pada hari ke-19 sehingga pada saat terminasi hari ke-21 didapatkan hanya 5 sampel otak tikus perlakuan. Penyebab tikus perlakuan (Pk 6) mati diduga diakibatkan oleh *overforce* pada saat pembuatan hewan model sehingga mengalami pendarahan juga pada mata kiri. Selain itu pada penelitian ini menempatkan 5 tikus dalam 1 kandang. Hal tersebut menyebabkan tikus stres sehingga muncul sifat kanibalisme akibat persaingan dalam mendapatkan makanan. Seperti pada penelitian yang

dilakukan oleh (Widyaswari & Probosari, 2013) terdapat 1 sampel tikus yang mati akibat kanibalisme dikarenakan faktor lingkungan yaitu penggunaan 1 kandang untuk 3 tikus. Faktor lain penyebab stress tikus pada penelitian ini adalah cara pemberian obat dengan menggunakan sonde dalam jangka waktu lama dimana dilakukan sekali sehari selama 21-hari. Dari banyak penelitian sepakat bawa stress dapat mengganggu proses neurogenesis (Levone *et al.*, 2015).

Menurut (Schoenfeld & Gould, 2012) terdapat dua mekanisme efek stress terhadap neurogenesis. Pertama yaitu stres melibatkan Hipotalamus-Hipofisis-Adrenal (HPA) Aksis yang menghasilkan glukokortikoid yang dapat mengganggu neurogenesis. Kemudian stress juga meningkatkan kadar sitokin seperti interleukin 1 (IL1) pada otak. Peningkatan IL1 kemudian juga akan mengaktifkan HPA Aksis sebagai respon dari stress. IL1 merupakan sitokin pro inflamasi yang dihasilkan oleh kelenjar adrenal yang dapat menghambat proliferasi dan difrensiasi sel syaraf serta mempercepat kematian sel syaraf.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Tidak didapatkan peningkatan neurogenesis dengan pemberian ekstrak kombinasi pegagan, kayu manis, dan spirulina pada tikus dengan cedera otak traumatis fase kronis.

Saran

1. Untuk mengetahui efek obat dalam meningkatkan neurogenesis, perlu dilakukan penelitian lebih lama yaitu diatas 28 hari.
2. Melakukan perhitungan dosis yang tidak spekulatif dan menggunakan serial dosis.
3. Menggunakan marker yang sesuai dengan waktu terminasi.
4. Dilakukan penilaian lain seperti sampel darah tikus dan kemampuan kognitif tikus.

LAMPIRAN

A. Foto penelitian





Surat Persetujuan Etik



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS MATARAM
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Jalan Pendidikan No.37, Telp. 640874 Fax. 641717 Mataram 83125 - NTB

SURAT KEPUTUSAN PERSETUJUAN ETIK

No: 468/UN18.F8/ETIK/2023

Tanggal: 7 November 2023

Dengan ini menyatakan bahwa protokol dan dokumen yang berhubungan dengan protokol berikut ini telah mendapatkan persetujuan etik :

No. Protokol	UNRAM2471023	Sponsor : Mandiri
Judul Penelitian	Peran obat kombinasi pegegan, kayu manis, dan spirulina dalam meningkatkan neurogenesis pada otak tikus dengan cedera otak traumatis fase kronis	
Ketua Peneliti	Amrullah Muliawan. H	
Anggota Peneliti	Dr. dr. Bambang Priyanto, Sp.BS (K), dr. Lale Maulin Prihatina, Sp. PA	
Tempat Penelitian	Lab. Hewan Prodi Pendidikan dokter, Lab. Anatomi Fakultas kedokteran Unram, Lab. Histologi Kedokteran Unram	
Masa Berlaku	7 November 2023 – 7 November 2024	
Jenis Review	<input checked="" type="checkbox"/> Exempted <input type="checkbox"/> Expedited <input type="checkbox"/> Fullboard	
Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan FK Unram	Nama : dr. Ario Danianto, Sp. OG	Tanda tangan,  
Wakil Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan FK Unram	Nama : dr. Linda Silvana Sari, M.Biomed., Sp.A	Tanda tangan,  

Catatan :

1. Peneliti wajib menyerahkan hasil penelitian selambat – lambatya 1 (satu) bulan setelah selesai penelitian kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Unram. Apabila laporan penelitian tidak diserahkan, maka Komisi Etik berhak untuk membatalkan persetujuan yang diberikan.
2. Apabila pelaksanaan penelitian tidak sesuai dengan usulan kegiatan, Komisi Etik tidak bertanggung jawab terhadap kelayakan etik penelitian tersebut.
3. Apabila ada perubahan prosedur/kegiatan penelitian, mohon agar mengusulkan kembali proposal kelayakan etik kepada Komisi Etik.
4. Penyalahgunaan terhadap Surat Keputusan Persetujuan Telaah Etik menjadi tanggung jawab peneliti.

