

ARTIKEL PENELITIAN

Pengaruh *Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells* terhadap Gambaran Sel Saraf pada Daerah Hippocampus Tikus *Like Model* Alzheimer

Reza Yuneri Putri¹, Nita Afriani², Yuliarni Syafrita³

1. Program Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Andalas; 2. Departemen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas; 3. Departemen Neurologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

Korespondensi: Reza Yuneri Putri, rezayunerip@gmail.com, 082287365661

Abstrak

Tujuan: Mengetahui pengaruh pemberian *human wharton's jelly mesenchymal stem cell* (HWJ-MSC) terhadap gambaran kerusakan sel saraf pada daerah hippocampus tikus like model Alzheimer.

Metode: Penelitian ini menggunakan 21 ekor tikus jantan putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (diberikan pakan biasa), kelompok kontrol positif (diinduksi dengan AIC3 melalui oral selama 5 hari), dan kelompok perlakuan (kelompok yang diinduksi AIC3 selama 5 hari dan dilanjutkan pemberian HWJ-MSC selama 28 hari). Tikus dilakukan terminasi dan diambil organ otaknya kemudian dilakukan pemotongan jaringan serta pewarnaan Hematoxylin Eosin. Preparat otak tikus pada daerah hippocampus diamati menggunakan mikroskop cahaya kemudian dilakukan perhitungan kerusakan sel saraf yang terjadi pada setiap kelompok hewan coba. **Hasil :** Terdapat banyak sel saraf yang mengalami kerusakan pada kelompok kontrol positif dibandingkan kelompok perlakuan dan kelompok kontrol negatif. **Kesimpulan :** Hal ini menunjukkan adanya pengaruh dari HWJ-MSC terhadap gambaran kerusakan sel saraf pada daerah hippocampus tikus like model Alzheimer.

Kata kunci: Saraf; Alzheimer; AIC3; HWJ-MSC

Abstract

Objective : To determine the effect of giving *Human Wharton's Jelly-derived Mesenchymal Stem Cells* (HWJ-MSCs) on the description of nerve cell damage in the hippocampus area of mice like Alzheimer's models. **Methods:** This study used 21 male white mice (*Rattus norvegicus*) Wistar strain. Rats were divided into 3 groups, namely the negative control (given regular feed), positive control group (induced with AIC 3 orally for 5 days), and the treatment group (the group induced by AIC 3 for 5 days and continued with HWJ-MSC for 28 days). Mice were terminated and the brain organs were taken and then the tissue was cut and stained Hematoxylin Eosin. Rat brain preparations in the hippocampus area were observed using light microscopy then calculate the nerve cell damage that occurs in the each group of experimental animals. **Result:** There are many nerve cells that are damaged in the positive control group compared to the treatment group and the control group negative. **Conclusion:** This shows the effect of HWJ-MSC on depiction of neuronal cell damage in the rat hippocampus area like the Alzheimer's model.

Keywords: Nerve; Alzheimer; AIC3; HWJ-MSCs

PENDAHULUAN

Kajian mengenai *world population aging* dari data Perserikatan Bangsa-Bangsa (PBB) menyatakan pada tahun 2050 diproyeksikan bahwa jumlah penduduk lanjut usia (lansia) di dunia meningkat hingga 2 miliar jiwa. Peningkatan jumlah lansia di dunia juga menggambarkan adanya peningkatan jumlah penduduk lansia di Indonesia yang telah diketahui yaitu pada tahun 2014 dengan jumlah penduduk lansianya adalah 20,24 juta atau 8,03% dari total penduduk Indonesia dan pada tahun 2045 diproyeksikan meningkat drastis hingga 57 juta jiwa atau 17,9%.¹ Peningkatan jumlah ini juga dapat berdampak pada tingginya angka penyakit degeneratif atau penyakit akibat adanya perubahan pada sel tubuh yang memengaruhi fungsi organ secara menyeluruh karena proses penuaan. Salah satu penyakit degeneratif yang progresif dan tersering di bidang neurologi adalah penyakit Alzheimer.²

Penyakit Alzheimer merupakan penyakit degeneratif yang dapat merusak sel kompartemen otak serta berhubungan dengan berkurangnya fungsi kognitif, perubahan perilaku, sosialisasi dan komunikasi penderita. Penyakit Alzheimer menjadi salah satu masalah terbesar pada status kesehatan penduduk lansia di dunia dan kejadian penyakit ini semakin meningkat diikuti peningkatan usia yaitu pada individu yang berusia 65 tahun atau lebih, namun hal ini bukan berarti menyatakan bahwa usia dibawah 65 tahun tidak berisiko terkena penyakit Alzheimer karena penyakit Alzheimer ada yang bersifat familial (dibawah 65 tahun) dan sporadik (lebih dari 65 tahun).^{3,4}

Insiden Alzheimer di dunia pada tahun 2016 mencapai 46 juta jiwa dari seluruh jumlah penduduk lansia dunia dan

22 juta diantaranya berada di Asia. Estimasi insiden di Indonesia pada tahun 2013 mencapai 1 juta orang dan akan meningkat drastis pada tahun 2030 hingga akan mencapai 4 juta orang diprediksikan pada tahun 2050 dari seluruh penduduk lansia di Indonesia mengalami penyakit Alzheimer. Angka kematian akibat Alzheimer dari tahun 2000 hingga 2018 dilaporkan mengalami kenaikan dua kali lipat mencapai 146% di dunia.^{4,5} Tingginya insiden dan angka kematian akibat penyakit ini disebabkan oleh beberapa alasan seperti kurangnya pengetahuan masyarakat terhadap Alzheimer, belum dikembangkan terapi definitif dari Alzheimer, penyebab Alzheimer yang multifaktor, insiden yang meningkat di usia tua, dan beberapa faktor lain.^{4,6}

Perjalanan penyakit Alzheimer didasari beberapa hipotesis. Hipotesis yang diutarakan para ahli cukup banyak, hal ini terjadi karena penyebab pasti dari penyakit Alzheimer sepenuhnya belum diketahui namun pada dasarnya penyakit Alzheimer ini ditandai dengan terakumulasinya protein plak β -Amiloid ($A\beta$) dan terbentuknya *neurofibrillary tangles* melalui beberapa mekanisme tertentu. Pembentukan protein yang abnormal pada tubuh akan mencetuskan sitokin proinflamasi sebagai bentuk adaptasi tubuh terhadap benda asing sehingga peningkatan sitokin proinflamasi ini akan merusak jaringan otak termasuk sel saraf. Sel saraf sangat penting bagi tubuh dalam menjalankan kegiatan sehari-hari. Kerusakan sel saraf akibat penyakit Alzheimer berawal dari daerah *hippocampus* sehingga menimbulkan manifestasi klinis penurunan fungsi kognitif. Penelitian pada hewan coba juga menunjukkan hal yang sama, sehingga daerah *hippocampus* dapat menjadi

parameter terjadinya kerusakan sel saraf akibat penginduksian Alzheimer.⁷

Penelitian sebelumnya pada hewan coba dapat menggambarkan hewan coba seperti model Alzheimer, penelitian tersebut menginduksi hewan coba menggunakan zat kimia Aluminium Klorida (AlCl₃). Mekanisme AlCl₃ diketahui dapat meningkatkan ekspresi gen *Amyloid Precursor Protein* (APP) sehingga dapat mengakibatkan penumpukan plak A β dan mengakibatkan kerusakan sel saraf pada tikus/hewan percobaan sehingga tikus/hewan coba tersebut dapat menggambarkan model seperti Alzheimer. Perkembangan terapi untuk Alzheimer cukup berkembang pesat seperti terapi psikososial dan farmakoterapi, namun angka mortalitas, morbiditas dan beban biaya yang dikeluarkan pemerintah semakin tinggi. Perkembangan terapi di Indonesia saat ini masih terbatas karena mekanisme penyakit Alzheimer ini bervariasi dan diperberat oleh salah satunya ketidakmampuan sel saraf otak beregenerasi sendiri maka pendekatan terapi hanya bertujuan untuk memperlambat kerusakan otak dan memperbaiki kualitas hidup tanpa memperbaiki kerusakan fungsional yang ditimbulkan oleh penyakit Alzheimer.⁸ Saat ini terapi tingkat sel terbukti mampu membantu proliferasi sel saraf sekaligus sebagai imunomodulator yaitu terapi *stem cell*.^{9,10}

Terapi *stem cell* merupakan terapi menggunakan sel induk dengan tujuan mampu berdiferensiasi menjadi sel yang diinginkan, sel induk / *stem cell* diklasifikasikan berdasar potensi diferensiasinya terdiri dari totipoten, pluripoten, multipoten, dan unipoten.¹¹ *Food and Drug Administration* (FDA) saat ini lebih merekomendasikan stem sel yang bersifat multipoten (kemampuan sel

berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel dalam satu golongan, seperti hematopoietik, sistem saraf dan pembentukan darah) sebagai terapi dan masih belum ada izin lebih lanjut dari jenis stem sel lain yang telah diizinkan karena harus melakukan penelitian beberapa tahap.¹² Salah satu *stem cell* yang bersifat multipoten adalah *mesenchymal stem cell* (MSC). Selain bersifat multipoten MSC diketahui dapat menjadi imunomodulator dan anti-inflamasi. *Mesenchymal stem cell* dapat berasal dari tali pusat, sumsum tulang, jaringan adiposa, cairan amnion.¹³

Lokasi atau sumber pengambilan MSC ini perlu dipertimbangkan tindakan, manfaat, efek samping dan faktor lainnya terhadap organ asal tersebut. *Mesenchymal stem cell* yang berasal dari tali pusat sangat menjanjikan karena tindakan pengambilan yang tidak invasif, merupakan organ fetus yang pada akhirnya dibuang, tali pusat sangat mudah ditemukan, dan setiap tahunnya angka kelahiran terus meningkat. Tali pusat memiliki beberapa struktur umum yaitu selaput membran tali pusat, lapisan *wharton's jelly* (WJ), vena umbilikalis, dan arteri umbilikalis. Lapisan *wharton's jelly* pada tali pusat merupakan suatu mukus penghubung jaringan epitelium amnion dengan pembuluh darah umbilikalis.^{14,15} Lapisan WJ terbukti menjadi lapisan terbaik dari bagian tali pusat untuk diisolasi menjadi MSC (HWJ-MSC). Hal ini dikarenakan WJ terbukti mempunyai banyak manfaat klinis, seperti memiliki lebih sedikit kontaminan sel *non-stem cell*, dapat dihasilkan dalam jumlah besar dengan kultur yang minimal untuk menghindari perubahan fenotip, isolasinya mudah dan cepat untuk distandarisasi, kaya akan kandungan MSC dibandingkan lapisan lain (4,61 \pm 0,57 x 10⁶/cm) dan memiliki tingkat diferensiasi yang tinggi.¹⁶

Berdasarkan uraian diatas peneliti tertarik melakukan penelitian mengenai potensi HWJ-MSC sebagai salah satu bentuk perkembangan terapi sel melalui analisis pengaruh *human wharton's jelly mesenchymal stem cell* terhadap gambaran sel saraf pada tikus yang diinduksi seperti Alzheimer sebagai salah satu penelitian yang dapat mengurangi permasalahan yang telah penulis paparkan terkait penyakit Alzheimer dan juga bentuk dukungan dari salah satu 17 program *Sustainable Development Goals (SDGs) 2030*.

METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi, Laboratorium Patologi Anatomi, dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Jenis penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan rancangan *the post test only control group design*. Populasi yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* jantan. Sampel yang digunakan tikus berumur 2 bulan dengan berat badan 200-300 gram. Penentuan besar sampel dilakukan sesuai dengan kriteria *World Health Organization (WHO)*, yang menetapkan jumlah sampel minimal setiap kelompok untuk penelitian eksperimental hewan coba adalah lima ekor tikus Untuk mencegah terjadinya *drop out* selama penelitian karena tikus mati atau tidak sesuai dengan yang diharapkan, maka dilakukan koreksi besar sampel dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$n' = \frac{n}{(1-f)}$$

Sehingga didapatkan 6 tikus setiap

kelompok. Untuk menghindari kemungkinan adanya kriteria eksklusi, peneliti mengambil jumlah 7 ekor setiap kelompok. Penelitian ini menggunakan 21 ekor tikus jantan putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar*. Tikus yang diambil adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Wistar* jantan dengan berat badan tikus adalah 200-300 gram, dan tikus berumur 2 bulan (6-8 minggu) saat pemilihan sampel. Apabila adanya tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang memiliki cacat anatomi, dan tikus yang tampak sakit, ditandai dengan tidak mau makan, tidak bergerak aktif, dan rambut yang rontok. Kriteria tersebut tidak diambil sebagai sampel penelitian. Pengambilan sampel diambil secara acak (*simple random sampling*).

Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (diberikan pakan biasa), kelompok kontrol positif (diinduksi dengan $AlCl_3$ melalui oral selama 5 hari dengan dosis 300 mg/KgBB), dan kelompok perlakuan (kelompok yang diinduksi $AlCl_3$ selama 5 hari dan dilanjutkan pemberian HWJ-MSC dengan dosis 1×10^6 dalam 300 μ l medium selama 28 hari. Tikus dilakukan terminasi dan diambil organ otaknya kemudian dilakukan pembedahan jaringan serta pewarnaan *Hematoxylin Eosin*. Preparat otak tikus pada daerah *hippocampus* diamati menggunakan mikroskop cahaya kemudian dilakukan perhitungan kerusakan sel saraf yang terjadi pada setiap kelompok hewan coba. Data diolah dan dianalisis menggunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis* karena data tidak terdistribusi secara homogen. Penelitian sebelumnya sudah mendapatkan surat lolos kaji etik yang dikeluarkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Andalas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil perhitungan sel saraf yang didapatkan pada setiap kelompok penelitian didapatkan nilai rerata total persentase kerusakan sel saraf pada kelompok kontrol negatif, positif dan perlakuan secara berturut-turut adalah 15,8%, 80,8%, dan 18,8%. Persentase pada kelompok kontrol positif merupakan persentase kerusakan sel saraf tertinggi dibandingkan kelompok lainnya (**Tabel 1**).

Tabel 1. Hasil penghitungan rerata kerusakan sel saraf

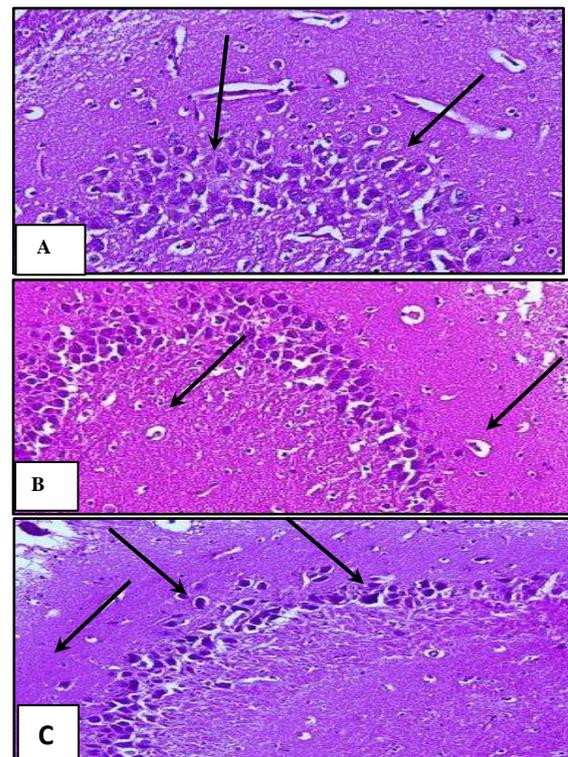
| Kelompok | Persentase Sel Saraf Otak Daerah <i>Hippocampus</i> yang Mengalami Kerusakan | | |
|----------|--|----------------|-------------|
| | K(-) (n= 6) | K(+) (n= 6) | P (n= 6) |
| Tikus 1 | 16,8 | 85,5 | 21,7 |
| Tikus 2 | 14,7 | 76,7 | 16,6 |
| Tikus 3 | 15,8 | 83,8 | 17,6 |
| Tikus 4 | 15,8 | 78,2 | 19,4 |
| Tikus 5 | 14,5 | 81,2 | 20,8 |
| Tikus 6 | 17,1 | 79,3 | 16,8 |
| median | 15,8 | 80,2 | 18,5 |
| minimum | 14,5 | 76,7 | 16,6 |
| maksimum | 17,1 | 85,5 | 21,7 |

Keterangan tabel :

- n : jumlah hewan coba
- K(-) : kelompok kontrol negatif
- K(+): kelompok kontrol positif
- P : kelompok perlakuan

Secara mikroskopis jaringan otak dilihat dengan perbesaran 200X. Daerah *hippocampus* yang cukup kecil lebih baik dihitung pada perbesaran 200X untuk perhitungan sel saraf dan dilakukan analisis statistik lebih lanjut. Pada kelompok negatif yang tidak mendapatkan pemberian $AlCl_3$ ataupun HWJ-MSc dan kelompok perlakuan yang sebelumnya mendapat $AlCl_3$ dan juga diberikan HWJ-MSc, kedua kelompok ini terlihat gambaran sel saraf normal berbentuk piramidal (tanda panah). Sel yang rusak sangat sedikit sekali ditemukan pada

gambaran ini. Pada kelompok kontrol positif yang mendapatkan pemberian $AlCl_3$ saja. Kelompok ini ditemukan adanya sel saraf yang rusak ditandai dengan inti yang tampak menggelap dan mengalami penyusutan (piknotik). Selain itu juga ditemukan adanya zona jernih yang mengelilingi sel saraf yang mengindikasikan adanya proses edema intraseluler (**Gambar 1**).



Gambar 1. Gambaran mikroskopis daerah *hippocampus* perbesaran 200X.

Pewarnaan H&E. A) Kelompok kontrol negatif. Sel saraf normal ditunjukkan oleh tanda panah; B) Kelompok kontrol positif, terlihat adanya sel saraf yang rusak (tanda panah), dan zona jernih yang mengelilingi sel saraf (tanda panah) dan C) Kelompok perlakuan terlihat adanya sel saraf yang normal.

Gambaran sel saraf yang mengalami kerusakan pada kelompok kontrol positif lebih banyak dibandingkan kelompok lainnya. Kelompok positif ini merupakan tikus yang diinduksi *like* model Alzheimer dengan parameter plak

Alzheimer'snya adalah plak A β dibuktikan oleh penelitian sebelumnya. Pada penelitian ini yang menjadi parameter adalah kerusakan sel saraf yang diinduksi oleh senyawa kimia AlCl₃. Aluminium ini mampu melewati *blood brain barrier* (BBB) melalui afinitas tinggi dari reseptor spesifik transferin.¹⁷ Akumulasi senyawa AlCl₃ diketahui dapat mencapai *hippocampus* dan korteks. Akumulasi AlCl₃ yang bersifat neurotoksisitas ini memengaruhi ekspresi gen APP. Terjadi peningkatan gen APP akibat akumulasi AlCl₃, sehingga menginduksi terakumulasinya plak oligomer β -amiloid.

Secara molekuler plak oligomer β -amiloid ini mampu merusak sel saraf melalui pensinyalan *apoptotic signal-regulating kinase 1* (ASK-1) dan *c-jun N-terminal kinase* (JNK). Dimana ASK-1 memiliki peranan dalam respon seluler terhadap berbagai stres lingkungan di biologis yang disebabkan oleh agregasi protein, masuknya ion kalsium, lipopolisakarida, dan sitokin-sitokin yang terlibat dalam apoptosis intrinsik dengan mempengaruhi pelepasan sitokrom. Sementara JNK menjadi enzim transduksi mengatur proses biologis seperti proliferasi sel, kelangsungan hidup, dan diferensiasi, namun aktivator ektopik seperti stres oksidatif, tekanan lingkungan dan rangsangan apoptosis akhirnya mengaktifkan JNK sehingga memediasi paradigma seperti apoptosis, peradangan, perbaikan DNA dan juga termasuk fosforilasi protein. Jadi apabila JNK diaktivasi sementara waktu dapat mendukung kelangsungan hidup sel, namun apabila di aktivasi berkepanjangan akan menginduksi terjadinya apoptosis seluler.¹⁸

Pada kelompok perlakuan sel saraf yang mengalami kerusakan tidak sebanyak yang ada pada kelompok positif. Hal ini

mengasumsikan bahwa HWJ-MSC memberikan pengaruh baik terhadap gambaran mikroskopis sel saraf. Berbanding lurus dengan beberapa teori yang terkait hubungan HWJ-MSC dengan sel saraf. HWJ-MSC berpotensi menggantikan sel saraf yang sudah rusak menjadi sel saraf baru lagi dengan mekanisme parakrin yang menjadi keunggulan dari HWJ-MSC.¹⁹

Human wharton's jelly mesenchymal stem cells diketahui mampu mengeluarkan vesikel ekstraseluler. Vesikel ini dikeluarkan oleh sel HWJ-MSC dengan ukuran, morfologi dan konten yang berbeda yang nantinya akan berinteraksi dengan sel target sehingga memengaruhi fenotip dan fungsi tertentu dari interaksi yang dihasilkan. Diketahui juga bahwa vesikel ekstraseluler yang dihasilkan oleh HWJ-MSC mampu melewati sawar darah otak, sehingga sangat cocok diaplikasikan untuk membantu proliferasi sel-sel saraf yang sudah rusak pada jaringan otak. *Human wharton's jelly mesenchymal stem cells* mampu menurunkan aktivitas astrosit, mikroglia, menurunkan regulasi sitokin pro-inflamasi IL-1- β dan TNF- α , meningkatkan sitokin anti-inflamasi seperti IL-4 dan IL-10, serta meningkatkan fungsi memori tikus transgenik *like* model Alzheimer. Selama terbentuknya plak A β maka stres oksidatif akan terus meningkat, namun HWJ-MSC resisten terhadap stres oksidatif karena memiliki enzim anti-oksidan yang tinggi sehingga bisa bekerja dengan baik pada kondisi inflamasi yang meningkat.²⁰

Berdasarkan hasil uji homogenitas didapatkan nilai $p < 0,05$ yakni 0,026 sehingga tidak dapat dilakukan uji *One Way ANOVA*. Selanjutnya analisis data dilakukan dengan menggunakan uji alternatif *Kruskal-Wallis*. Uji *Kruskal-Wallis* bertujuan untuk mengetahui bermakna

atau tidaknya perbedaan rerata persentase kerusakan sel saraf setiap kelompok secara statistik. Hasil pengujian menunjukkan ada perbedaan rerata persentase kerusakan sel saraf pada daerah *hippocampus* pada semua kelompok penelitian secara bermakna dengan nilai $p = 0,001$ ($p < 0,05$) setelah pemberian HWJ-MSC 1×10^6 dalam $300 \mu\text{l}$ medium. Untuk mengetahui perbedaan signifikansi pada masing-masing kelompok dilakukan analisis lebih lanjut dengan menggunakan *Mann-Whitney U Test* (MWUT) (**Tabel 2**).

Tabel 2. Hasil uji MWUT

| Kelompok Penelitian | | P |
|---------------------|-------------|--------|
| Kontrol (-) | Kontrol (+) | 0.004* |
| | Perlakuan | 0.020* |
| Kontrol (+) | Kontrol (-) | 0.004* |
| | Perlakuan | 0.004* |
| Perlakuan | Kontrol (-) | 0.020* |
| | Kontrol (+) | 0.004* |

Keterangan tabel : *perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai p untuk untuk perbandingan perbedaan kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif dan juga kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan adalah 0,004 . Nilai p untuk perbandingan kelompok kontrol negatif dengan perlakuan 0,02 ($p < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa perbedaan yang bermakna terjadi pada semua kelompok.

SIMPULAN

Terdapat Pengaruh pemberian *human wharton's jelly mesenchymal stem cells* terhadap gambaran sel saraf pada daerah *hippocampus* tikus yang diinduksi like model Alzheimer melalui penurunan kerusakan sel saraf pada daerah *hippocampus*.

DUKUNGAN FINANSIAL

Pendanaan dari PNPB Tahun 2021.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan Terimakasih kepada Dr. dr. Afriwardi, Sp.KO, SH, MA selaku Dekan beserta Wakil Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. dr. Hirowati Ali, PhD yang sudah memberikan kesempatan untuk bergabung penelitian sepayung dengan beliau Dr. Gusti Revilla, M.Kes, dan dr. Aswiyanti, Asri M.Si.Med, Sp.PA(K) yang telah memberikan arahan dan evaluasi dalam penelitian, kepada dr. Tofrizal, Sp.PA, M.Biomed, PhD yang telah memberikan arahan pada penulis terkait ilmu patologi anatomi serta segala pihak yang telah membantu penulis selama penelitian.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penelitian ini telah dilakukan sesuai dengan prosedur yang ada, namun tentu masih terdapat keterbatasan penelitian. Adapun Keterbatasan pada penelitian ini adalah penggunaan jenis pewarnaan H&E pada jaringan otak di daerah *hippocampus* tidak bisa menentukan morfologi sel saraf yang detail. Parameter yang dinilai pada penelitian ini hanya sel saraf sementara parameter Penyakit Alzheimer cukup banyak.

DAFTAR PUSTAKA

1. Subdirektorat Statistik Pendidikan Kesejahteraan Sosial. Statistik Penduduk Lanjut Usia 2019. Badan Pusat Statistik. 2019: 13-21
2. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI. Riset kesehatan dasar (RISKESDAS) tahun 2016. <https://www.kemkes.go.id/article/view/16031000003/menkes-lansia> yang-

- sehat-lansia-yang-jauh-dari-demensia.html.2016. Diakses 10 November 2020
3. Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet*. 2016;388(10043):505
 4. Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, Villegas S. Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(4):1171-83.
 5. Lane CA, Ardy J, Schott JM. Alzheimer's Disease. *Eur J Neurol*. 2017;25: 59-70
 6. Centers for Disease Control and Prevention. About Underlying Cause of Death, 1999-2019. <https://wonder.cdc.gov/ucd-icd10.html>
 7. Sheppard O, Coleman M. Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. In: Huang X, editor. *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. Brisbane (AU): Exon Publications; 2020 Des 18. Chapter 1.5-6
 8. Alzheimer Association Report. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2020; 16:391-460
 9. Keputusan Menteri Kesehatan RI. Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Jiwa. 2015; 10-12
 10. Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadi S, Sargolzaei Aval F. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran*. 2017 Jan;55(1):6-23.
 11. Grochowski C, Radzikowska E, Maciejewski R. Neural stem cell therapy-Brief review. *Clin Neurol Neurosurg*. 2018 Oct;173:8-14
 12. Food and Drug Administration. Customer Alert on Regenerative Medicine Products Including Stem Cells and Exosomes. <https://www.fda.gov/vaccinesbloodbi> ologics/consumersbiologics/consumeralertregenerativemedicine-products-including-stem-cells-and-exosomes.2020. Diakses 10 November 2020
 13. Lo Furno D, Mannino G, Giuffrida R. Functional role of mesenchymal stem cells in the treatment of chronic neurodegenerative diseases. *J Cell Physiol*. 2018 May;233(5):3982-999.
 14. Marino L, Castaldi MA, Rosamilio R, Ragni E, Vitolo R, Fulgione C, Castaldi SG, Serio B, Bianco R, Guida M, Selleri C. Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Int J Stem Cells*. 2019; 12(2):218-26.
 15. Subramanian A, Fong CY, Biswas A, Bongso A. Comparative Characterization of Cells from the Various Compartments of the Human Umbilical Cord Shows that the Wharton's Jelly Compartment Provides the Best Source of Clinically Utilizable Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*. 2015; 10(6):127-132.
 16. Nakano M, Kubota K, Kobayashi E, Chikenji TS, Saito Y, Konari N, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve cognitive impairment in an Alzheimer's disease model by increasing the expression of microRNA-146a in hippocampus. *Sci Rep*. 2020;10(1):10772.
 17. Wang L. *Entry and deposit of aluminum in the brain*. *Adv Exp Med Biol* 2018;1091:39-51.
 18. Prakash D, Sudhandiran G. Dietary flavonoid fisetin regulates aluminium chloride-induced neuronal apoptosis in cortex and hippocampus of mice brain. *J Nutr Biochem*. 2015 Dec;26(12):1527-39.

19. Ibrahim AbdEl Fattah L, Zickri MB, Aal LA, Heikal O, Osama E. The Effect of Thymoquinone, $\alpha 7$ Receptor Agonist and $\alpha 7$ Receptor Allosteric Modulator on the Cerebral Cortex in Experimentally Induced Alzheimer's Disease in Relation to MSCs Activation. *Int J Stem Cells*. 2016;9(2):230-8.
20. Bodart-Santos V, de Carvalho LRP, de Godoy MA, Batista AF, Saraiva LM, Lima LG, *et al*. Extracellular vesicles derived from human Wharton's jelly mesenchymal stem cells protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- β oligomers. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Nov 20;10(1):332.