

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Cedera otak traumatik (COT) adalah salah satu penyebab utama kematian dan penurunan kualitas hidup pada individu yang berumur kurang dari 45 tahun secara global.¹ COT adalah dampak dari benturan, penetrasi, atau gerakan otak yang cepat dalam tengkorak, yang disebabkan oleh kekuatan eksternal, bisa menyebabkan gangguan fungsi otak yang muncul sebagai penurunan tingkat kesadaran dan gangguan neurologis.² COT juga biasanya didefinisikan sebagai perubahan fungsi otak yang ditunjukkan oleh kebingungan (*confusion*), perubahan tingkat kesadaran, kejang, defisit neurologis sensorik atau motorik, hingga koma yang disebabkan oleh adanya tekanan dari benda tumpul atau penetrasi benda tajam yang masuk ke dalam kepala.³

Di Amerika Serikat ada sekitar 1,5 juta orang setiap tahun menderita cedera otak, dan angka kematian akibat cedera otak berat adalah antara 35 hingga 40%.⁴ Meski data epidemiologi tentang cedera otak di Indonesia masih terbatas, data yang ada menunjukkan tren peningkatan dari tahun ke tahun. Menurut data dari Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) tahun 2018,



cedera otak di Indonesia mencapai 11,9% dari total kasus trauma, persentase tertinggi 17,9% di Gorontalo.⁵ Prevalensi mortalitas

COT pada laki-laki tiga kali lebih tinggi daripada perempuan yaitu sebesar 28,8 per 100.000 penduduk jika dibandingkan dengan perempuan yang hanya sebesar 9,1 kasus per 100.000 penduduk. Insiden cedera otak lebih tinggi pada laki-laki dibandingkan perempuan, sebagian besar disebabkan oleh aktivitas berisiko tinggi, risiko kerja, dan cedera yang berkaitan dengan kekerasan. Terjadi peningkatan insiden sebanyak 2 kali lipat pada kelompok pasien berusia 5-14 tahun. Puncak insiden pada laki-laki dan perempuan terjadi pada usia dewasa muda dengan angka insidensi mencapai 250 kasus per 100.000 populasi. Hampir 20% di antaranya mengalami cedera otak derajat sedang dan berat.⁶

Cedera jaringan dan gangguan aliran darah otak adalah ciri khas tahap awal COT. Kondisi ini memicu glikolisis anaerobik, yang menghasilkan penumpukan asam laktat, peningkatan permeabilitas membran, dan edema. Kegagalan metabolisme anaerobik dalam mempertahankan tingkat energi seluler mengakibatkan penurunan ATP dan kerusakan pada pompa ion membran yang membutuhkan energi.⁷ Gangguan aliran darah otak dan glikolisis anaerobik ini berlanjut pada kerusakan sekunder, yaitu terjadinya gangguan depolarisasi membran dan pelepasan neurotransmitter eksitatorik (seperti glutamat dan aspartat) secara berlebihan. Aktivasi *N-metil-D-aspartat*, *α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionat*, dan arus Ca^{2+} dan Na^{+} yang bergantung pada



n dapat menyebabkan proses katabolik intraseluler (*autodigestion*).
+ memicu aktivasi protease, fosfolipase, dan peroksida lipid, yang

mengakibatkan peningkatan konsentrasi asam lemak bebas intraseluler dan radikal bebas. Kaspase, endonuklease, dan translokase juga diaktifkan, menyebabkan perubahan struktural pada membran seluler dan DNA nukleosom yang menyebabkan fragmentasi pada DNA dan disfungsi perbaikan DNA (DNA *repair*). Semua proses ini akan berujung pada kerusakan pada membran vaskular dan struktur seluler, yang dapat menyebabkan nekrosis atau apoptosis. Cedera sekunder biasanya terjadi dalam beberapa jam atau minggu.⁸

Studi yang telah dilakukan menunjukkan bahwa individu yang berhasil melalui fase akut dari COT dengan tingkat keparahan sedang hingga berat masih memiliki risiko tinggi kematian selama masa pemulihan dan biasanya memiliki harapan hidup yang lebih pendek.⁹ Cedera mekanis langsung pada jaringan otak dapat mengakibatkan cedera difus dan fokal. Manifestasi klinis yang timbul sebagai akibat dari kerusakan otak ini meliputi koma, mual, sakit kepala, kejang, afasia, gangguan tidur, amnesia, hingga gangguan psikiatrik. Gejala-gejala ini dapat muncul dalam hitungan detik hingga jam setelah cedera.¹⁰ Lebih jauh lagi, kondisi ini juga memiliki konsekuensi jangka panjang yang dapat merusak kualitas hidup penderita. Beberapa penelitian telah mengidentifikasi kemungkinan hubungan antara cedera otak dengan perkembangan ensefalopati traumatis kronis dan penyakit Alzheimer di masa mendatang.¹¹



erbagai pendekatan terapeutik telah diterapkan dan dikembangkan
penatalaksanaan COT. Salah satunya yang saat ini sedang

berkembang adalah penggunaan *mesenchymal stem cells* (MSC). Aplikasi MSC pada lokasi COT dan cedera otak lainnya diketahui dapat mempercepat proses pemulihan dan meningkatkan fungsi kognitif melalui stimulasi neurogenesis dan penekanan inflamasi pada sistem saraf pusat (SSP). MSC pada lokasi cedera akan menyekresikan sekumpulan senyawa parakrin yang disebut *secretome*. Salah satu MSC yang banyak digunakan dalam terapi dan penelitian adalah MSC yang berasal dari tali pusar atau *umbilical cord* (UC-MSC). Tali pusar adalah sumber MSC yang paling sering digunakan dalam penelitian tentang *stem cells*. Hal ini dikarenakan pengambilan MSC di tali pusar sangat mudah dan non-invasif, sehingga tidak membahayakan ibu dan bayi dalam kandungan. Bagian tali pusar yang diambil dalam proses isolasi UC-MSC adalah jaringan *Wharton's jelly*, yaitu jaringan sel kuboid yang mengandung MSC dan merupakan bagian penyusun tali pusar yang paling dominan.^{12,13} Keunggulan lain dari UC-MSC dibandingkan dengan MSC lainnya adalah kemampuannya untuk membelah diri lebih baik dibandingkan berbagai jenis MSC lainnya, mempunyai imunogenitas yang relatif rendah, serta memiliki kemampuan untuk melakukan sekresi faktor parakrin, *secretome*.^{14,15}

Namun, terdapat beberapa keterbatasan dalam penggunaan MSC termasuk UC-MSC dalam penatalaksanaan penderita COT dalam praktek sehari-hari. MSC memerlukan proses kultur sel setiap kali akan digunakan



modalitas penatalaksanaan karena sel ini sulit untuk disimpan
jangka panjang.^{16,17} Sebagai alternatif, *secretome* dari MSC dapat

digunakan. *Secretome* adalah semua yang disekresikan oleh sel ke dalam medium ekstraseluler. Medium ini mengandung asam nukleat, lemak, protein, dan vesikel ekstraseluler (EV) atau mikrovesikel (MVs) yang mengandung berbagai sitokin, faktor pertumbuhan, dan protein lainnya yang dapat mempengaruhi fungsi sel lain di sekitarnya. Kandungan *secretome*, terutama asam nukleat seperti *messenger ribonucleic acid* (mRNA) dan *micro RNA* (miRNA), dapat meregulasi beberapa gen target dan berperan besar dalam proses penyembuhan cedera otak.¹⁸

Penelitian *in vitro* yang menggunakan *secretome* pada model hewan telah menunjukkan peningkatan kesintasan sel, laju proliferasi, dan migrasi sel yang bermakna, serta menunjukkan adanya penekanan respon inflamasi jaringan. Penggunaan *secretome* dibandingkan dengan MSC memiliki beberapa kelebihan. *Secretome* dapat diproduksi dengan mudah tanpa melalui proses kultur sel berulang yang membutuhkan waktu. Selain itu, *secretome* juga dapat diproduksi dalam jumlah besar dan disimpan dalam waktu yang lama tanpa menghilangkan kemampuan regenerasinya meski tanpa menggunakan agen cryopreservatif yang beracun, dan dapat dimodifikasi untuk efek tertentu. Selain itu, *secretome* dapat terus diproduksi oleh kultur yang sama sehingga setiap kali *secretome* ini dibutuhkan tidak diperlukan adanya pembuatan kultur baru. Oleh karena tingginya ketersediaan dan harga yang lebih terjangkau, *secretome* dapat



pilihan terapi yang menjanjikan bagi penderita COT, terutama diberikan pada fase akut.¹⁹

Keunggulan lain dari *secretome* adalah aspek keamanan penggunaannya yang tinggi akibat sifatnya yang tidak menggunakan sel hidup. Kumpulan studi-studi terdahulu menemukan efek yang bervariasi dari sel MSC terhadap tumor dengan beberapa studi menunjukkan adanya risiko terapi MSC dalam menunjang pertumbuhan sel tumor. Terapi *secretome* yang tidak menggunakan sel MSC secara langsung tentu terbebas dari risiko ini.²⁰ Selain itu, *secretome* terutama yang sudah dimodifikasi memiliki imunogenisitas yang rendah dibandingkan pemberian sel MSC hidup yang memiliki banyak antigen di permukaan membran plasmanya. Akibat imunogenisitasnya yang rendah, pemberian *secretome* berkali-kali juga memiliki risiko reaksi imun/anafilaksis yang rendah. Imunogenisitas yang rendah ini sudah banyak dibuktikan pada penelitian *in vitro* dan pada tikus.²¹

Eritropoietin (EPO) merupakan salah satu agen neuroprotektif yang telah banyak diteliti pada berbagai model cedera otak, termasuk oleh MF Said *et al* pada tahun 2021. Selain perannya dalam eritropoiesis, EPO diketahui memiliki efek antiinflamasi, antiapoptotik, dan angiogenik yang mendukung regenerasi jaringan saraf. Penggunaannya dalam penelitian eksperimental pada cedera otak traumatik memberikan referensi biologis yang dapat dibandingkan terhadap terapi baru. Oleh karena itu, dalam studi ini EPO digunakan sebagai kontrol positif untuk mengevaluasi efektivitas

ne UC-MSC dalam mendukung pemulihan struktur dan fungsi otak auma.



Terdapat beberapa tantangan yang dihadapi dalam penerapan *secretome* UC-MSC sebagai terapi COT yang perlu diatasi. Selain standarisasi produksi, di mana produksi *secretome* UC-MSC harus dilaksanakan dengan prosedur yang benar untuk menjamin konsistensi serta kualitas yang optimal. Proses ini harus dijalankan dalam kondisi stabil dan steril untuk menghindari kontaminasi atau pengaruh luar yang mungkin mempengaruhi kualitas *secretome*. Selain itu, pengembangan metode pengiriman yang efektif menjadi salah satu tantangan yang perlu diatasi sebelum *secretome* UC-MSC dapat diterapkan secara klinis. Metode pengiriman yang efisien akan membantu meningkatkan efektivitas terapi dan mengurangi efek samping yang mungkin timbul. Tantangan berikutnya adalah mengembangkan uji klinis yang efektif guna membuktikan keamanan dan efektivitas *secretome* UC-MSC dalam terapi COT. Uji klinis tersebut perlu dilakukan dengan protokol ketat dan melibatkan sejumlah sampel yang cukup untuk memastikan hasil yang valid dan akurat.

Terakhir, keterbatasan dalam memahami mekanisme kerja *secretome* UC-MSC menjadi tantangan tersendiri. Meskipun telah terbukti memiliki efek regeneratif pada sel-sel otak yang rusak, mekanisme kerja *secretome* UC-MSC belum sepenuhnya dimengerti. Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menggali bagaimana *secretome* UC-MSC berinteraksi dengan sel-sel otak serta memperbaiki jaringan otak yang

alami kerusakan. Secara umum, penggunaan *secretome* UC-MSC dalam terapi COT memang menunjukkan potensi yang menjanjikan.



Namun, masih diperlukan penelitian lebih lanjut untuk memahami potensi dan efek terapi ini secara lebih detail, mengingat masih dalam tahap awal pengembangan.²²

Beberapa *biomarker* dapat memprediksi efek dari COT. Beberapa *biomarker* tersebut juga dapat menjelaskan patologi spesifik atau proses penyembuhan dari COT yang relevan sesuai dengan jalur molekuler yang diwakili oleh *biomarker* tersebut. Beberapa senyawa diketahui memiliki hubungan dengan proses penyembuhan dari COT. *Brain-derived neurotrophic factors* (BDNF), *stromal cell derived factor-1* (SDF-1), dan *neuron-specific enolase* (NSE) adalah tiga molekul yang banyak diteliti dalam konteks cedera jaringan otak.

BDNF adalah jenis protein yang merupakan bagian dari neurotrofin dan merupakan bagian dari keluarga *neurotrophic growth factor*. SSP dan sistem saraf perifer keduanya dipengaruhi oleh BDNF. BDNF dapat menstimulasi pertumbuhan baru dan sinaps.^{23,24} Akibat efek neurogenik tersebut, ekspresi BDNF berpotensi menjadi penanda adanya perbaikan dari otak yang mengalami cedera. Pro-BDNF secara selektif mengaktifkan reseptor p75 dan sebagian besar memicu jalur persinyalan pro-apoptosis melalui reseptor BDNF dan jalur persinyalannya. BDNF berikatan dengan *tropomyosin-associated type-B receptor kinase* (TrkB) dan p75 dengan spesifisitas yang tinggi, kemudian berinteraksi terhadap dua reseptor ini

akan kematian atau kelangsungan hidup neuron.²⁵



SDF-1 adalah anggota keluarga kemokin CXC yaitu *CXC motif chemokine 12* (CXCL12). Dengan penyambungan diferensial RNA, dua isoform SDF-1 (SDF-1a dan SDF-1b) diproduksi dari gen tunggal, hanya berbeda empat asam amino pada C-terminus. SDF-1 memiliki struktur dasar yang sama pada manusia dan tikus, dengan hanya satu variasi asam amino. Peningkatan kadar SDF-1 juga meningkatkan proliferasi neuron setelah stroke, hal ini menunjukkan peran neuroprotektif SDF-1 dalam cedera otak.²⁶ Terapi SDF-1 juga telah terbukti menyebabkan apoptosis pada penderita leukemia myeloid akut, sementara menghambat apoptosis pada sel progenitor endotel dan sel mesenkim sumsum tulang. Hasil sebelumnya telah menunjukkan bahwa SDF-1 memberikan efek pro-apoptosis atau anti-apoptosis pada berbagai jenis sel.²⁷ Studi mengenai efek pemberian SDF-1 pada model tikus COT sudah pernah dilakukan sebelumnya. Injeksi SDF-1 pada tikus model untuk COT menunjukkan bahwa molekul ini dapat menstimulasi migrasi dari *neural stem cell* (NSC) pada area otak yang mengalami jejas. Stimulasi migrasi sel NSC ini diketahui dapat meningkatkan laju penyembuhan jaringan otak yang mengalami jejas.²⁸

NSE adalah *biomarker* kerusakan otak akut yang terlihat pada *cerebrospinal fluid* (CSF) dan darah, yang disebabkan oleh pecahnya membran sel neuron, dan merupakan tanda sensitif dari cedera otak yang

an oleh hipoksia, iskemia, atau trauma SSP. Keberadaan NSE *half-time* yang lebih lama di dalam darah dibandingkan dengan



biomarker inflamasi lainnya dapat menunjukkan adanya inflamasi otak dan kematian sel-sel saraf. Tingkat NSE yang tinggi dikaitkan dengan cedera sel neuron.²⁹

Melihat bagaimana *secretome* UC-MSC dan ketiga senyawa tersebut memiliki peran tersendiri dalam proses patofisiologi maupun penyembuhan COT, peneliti menduga bahwa terdapat hubungan antara pemberian *secretome* dan perubahan kadar BDNF, SDF-1, dan NSE pada jaringan SSP. Sayangnya, sampai saat ini data mengenai hubungan *secretome* dan ketiga senyawa tersebut masih terbatas dan belum ada penelitian di Indonesia yang membuktikan bahwa pemberian *secretome* efektif terhadap parameter seperti BDNF, SDF-1, dan NSE terutama pada penderita COT. Seperti yang sudah disebutkan sebelumnya, *secretome* diketahui dapat dipersiapkan dengan mudah, efisien secara biaya, dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama, serta memiliki aspek keamanan yang tinggi akibat tidak melibatkan pemberian sel hidup pada penderita. Keunggulan tersebut menyebabkan *secretome* berpotensi sebagai tata laksana yang dapat diaplikasikan pada penderita dengan COT terutama pada fase akut.

Melihat tahap perkembangan *secretome* saat ini yang masih di tahap awal, penelitian mengenai efek *secretome* ini akan dilakukan pada model tikus. Penggunaan model tikus dapat membantu peneliti dalam mempelajari

me cedera dan mempelajari suatu bagian spesifik dari mekanisme
ina cedera tersebut dapat menyebabkan kerusakan primer maupun



sekunder. *Strain* tikus yang banyak digunakan dalam penelitian adalah tikus model *Sprague-Dawley* (SD). Tikus ini pertama kali dikembangkan oleh Robert S. Dawley pada 1920 yang dibentuk dari hasil persilangan tikus Wistar dan tikus liar. Tikus ini dikenal sebagai tikus *outbred* yang berarti memiliki campuran gen dengan tikus liar yang menyebabkan latar belakang genetik dan fenotip yang bervariasi. Tikus ini sudah banyak digunakan sebagai model kondisi penyakit lain seperti diabetes, kanker, obesitas, dan penyakit kardiovaskular.³⁰ Dikarenakan memiliki fenotip yang bervariasi antar individunya, tikus ini sering dipakai sebagai tikus standar yang menggambarkan populasi manusia dengan genotip dan fenotipnya yang bervariasi antar individu.

Maka dari itu, penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh pemberian *secretome* UC-MSC terhadap perubahan ekspresi mRNA BDNF, kadar SDF-1, kadar NSE serum, histopatologi jaringan otak, dan *neurobehavioral* pada tikus *Sprague-Dawley* model cedera otak.

1.2 Rumusan Masalah



rkannya uraian dari latar belakang tersebut maka dapat dirumuskan masalah:

1. Bagaimana efek *secretome* UC-MSC terhadap perubahan ekspresi mRNA BDNF pada serum hewan coba yang mengalami COT?
2. Bagaimana efek *secretome* UC-MSC terhadap perubahan kadar SDF-1 pada serum dan jaringan otak hewan coba yang mengalami COT?
3. Bagaimana efek *secretome* UC-MSC terhadap perubahan kadar NSE pada serum dan jaringan otak hewan coba yang mengalami COT?
4. Bagaimana efek *secretome* UC-MSC terhadap gambaran histopatologi jaringan otak pada hewan coba yang mengalami COT?
5. Bagaimana efek *secretome* UC-MSC terhadap perubahan fungsi *neurobehavioral* pada hewan coba yang mengalami COT?
6. Bagaimana hubungan antara perubahan ekspresi mRNA BDNF, kadar SDF-1, dan kadar NSE terhadap gambaran jaringan histopatologi jaringan otak dan perubahan fungsi *neurobehavioral* hewan coba yang mengalami COT?



1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui peran pemberian *secretome* UC-MSC terhadap ekspresi mRNA BDNF, kadar SDF-1, kadar NSE, gambaran histopatologi jaringan otak, dan fungsi *neurobehavioral* pada hewan coba yang mengalami COT.

1.3.2 Tujuan Khusus

Berikut tujuan khusus dari penelitian ini:

1. Diketuainya efek pemberian *secretome* UC-MSC dalam perubahan ekspresi mRNA BDNF pada serum hewan coba yang mengalami COT.
 2. Diketuainya efek pemberian *secretome* UC-MSC dalam perubahan kadar SDF-1 pada serum dan jaringan otak hewan coba yang mengalami COT.
 3. Diketuainya efek pemberian *secretome* UC-MSC dalam perubahan kadar NSE pada serum dan jaringan otak hewan coba yang mengalami COT.
 4. Diketuainya efek pemberian *secretome* UC-MSC dalam perubahan jumlah sel radang pada gambaran histopatologi jaringan otak pada hewan coba yang mengalami COT.
- Diketuainya efek *secretome* UC-MSC pada perubahan fungsi *neurobehavioral* hewan coba yang mengalami COT.



6. Diketuinya hubungan antara perubahan ekspresi mRNA BDNF, kadar SDF-1, dan kadar NSE terhadap gambaran histopatologis jaringan otak dan perubahan fungsi *neurobehavioral* hewan coba yang mengalami COT.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoretik

Penelitian ini memperkaya landasan teoretis mengenai mekanisme kerja *secretome* UC-MSC pada COT khususnya dalam konteks neuromodulasi respon inflamasi, perlindungan terhadap kerusakan neuron, dan inisiasi proses neuroregeneratif. Pemahaman ini berkontribusi terhadap pengembangan konsep ilmiah tentang bagaimana terapi *cell-free* dapat mengintervensi jalur-jalur molekuler yang terlibat dalam patofisiologi cedera otak.

2. Manfaat Metodologis

Studi ini memberikan pendekatan eksperimental terpadu yang mengombinasikan model *in vivo* dengan evaluasi *biomarker* molekuler, fungsi *neurobehavioral*, dan histopatologi jaringan otak. Penggunaan waktu pengamatan yang spesifik (menghasilkan kerangka kerja metodologis yang relevan untuk menilai dinamika efek terapi dalam periode krusial proses sekunder cedera otak).



3. Manfaat Aplikatif

Secara aplikatif, hasil penelitian ini dapat menjadi dasar ilmiah untuk pengembangan terapi inovatif berbasis *secretome* UC-MSC pada COT. Efek antiinflamasi, neuroprotektif, dan neuroregenerasi memberikan justifikasi untuk melanjutkan ke tahap pra-klinik lanjutan atau uji klinis, dengan harapan meningkatkan prognosis dan pemulihan neurologis secara lebih efektif pada pasien dengan COT.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Cedera Otak Traumatik (COT)

2.1.1 Definisi

COT didefinisikan sebagai terjadinya penetrasi benda tajam, benturan, atau pergerakan cepat dari otak akibat gaya dari luar. Terjadinya benturan ini dapat berujung dengan gangguan fungsi saraf pusat yang bermanifestasi sebagai penurunan kesadaran, defisit sensoris fokal atau motoris, kejang, hingga koma.^{2,3} COT dapat memiliki efek jangka panjang ke semua aspek yang dapat mengurangi kualitas hidup pasien termasuk penurunan kognitif dan perubahan emosi dan tingkah laku. Cedera ringan seperti gegar otak (*concussion*) diketahui juga memiliki konsekuensi jangka panjang terutama dalam aspek kognitif dan mampu mengurangi kemampuan seseorang dalam menjalani kegiatan sehari-hari.³¹ Orang yang mengalami cedera otak akan terjadi kontusi dan laserasi pada permukaan otak yang berlanjut pada pendarahan intrakranial (fokal maupun difus), dan *diffuse axonal injury* (DAI) dengan gambaran berupa bola retraksi pada *white matter* pada pencitraan otak.³²



2.1.2 Etiologi dan Epidemiologi

Terdapat tiga penyebab utama terjadinya COT yaitu jatuh dari ketinggian (28%), kecelakaan lalu lintas (20%), dan kekerasan (11%). Selain itu, terdapat beberapa hal lain yang dapat menyebabkan COT seperti tertimpa benda jatuh dan kecelakaan saat olahraga. Secara umum etiologi COT dapat dibagi menjadi dua yaitu cedera tumpul dan cedera tembus. Cedera oleh kekerasan tumpul dapat menyebabkan fraktur dan *concussion*. Cedera tembus dapat terjadi akibat peluru maupun benda tajam.³³

COT merupakan penyebab morbiditas dan mortalitas utama untuk orang dengan usia muda di bawah 45 tahun di seluruh dunia.¹ Data epidemiologi dari Amerika Serikat menunjukkan bahwa terdapat sekitar 1,5 juta penderita mengalami cedera otak tiap tahunnya dengan angka mortalitas sebesar 35-40%.⁴ Di Indonesia, data mengenai insiden cedera kepala dikumpulkan oleh direktorat keselamatan transportasi darat departemen perhubungan. Data tersebut menunjukkan bahwa tiap tahunnya angka insiden dan kematian akibat kecelakaan lalu bervariasi. Pada tahun 2013, terdapat sebanyak 24.692 orang mengalami kecelakaan dengan jumlah kematian sebesar 39,9% dari total kasus kecelakaan. Tahun berikutnya pada tahun 2014 angka ini meningkat menjadi 32.271 orang dengan jumlah kematian sebesar 34,7%. Pada tahun 2015 angka an kembali meningkat menjadi 33.827 kasus dengan jumlah a sebesar 34,4%.⁵ Menurut data dari Riset Kesehatan Dasar (SDAS) tahun 2018, kasus cedera kepala di Indonesia menunjukkan



angka sebesar 11,9% dari keseluruhan total kasus trauma dengan persentase tertinggi mencapai 17,9% di Gorontalo.⁵ Data register dari rumah sakit tersier di Sumatra Utara menunjukkan bahwa mortalitas penderita COT di Indonesia mencapai 16,9%.³⁴ Terdapat perbedaan prevalensi cedera kepala antara laki-laki dan perempuan. Data dari *center for disease control and prevention* (CDC) tahun 2019 menunjukkan bahwa angka kematian akibat cedera otak pada laki-laki tiga kali lipat lebih tinggi dibandingkan perempuan (28,8 vs 9,1 kasus tiap 100.000 penduduk). Hal ini disebabkan oleh tingginya aktivitas berisiko tinggi akibat pekerjaan, kekerasan, olahraga, dan lainnya pada laki-laki dibandingkan perempuan. Insiden cedera otak juga diketahui meningkat dua kali lipat pada kelompok usia 5-14 tahun. Puncak insiden pada dewasa muda mencapai 250 kasus tiap 100.000 penduduk dengan 20% di antaranya mengalami cedera otak sedang hingga berat.⁶

2.1.3 Klasifikasi

COT dibagi menjadi dua klasifikasi besar yaitu cedera otak primer dan cedera otak sekunder.

1. Cedera Otak Primer

Definisi dari cedera primer adalah cedera yang terjadi segera setelah benturan/gaya luar mengenai kepala. Cedera otak primer meliputi kerusakan jaringan kulit hingga otak. Kerusakan primer sendiri dapat



bersifat fokal/lokal maupun difus. Cedera otak primer fokal hanya terjadi pada beberapa bagian tertentu saja. Yang termasuk cedera otak fokal di antara lain fraktur tulang kepala, pendarahan ekstrakranial, pendarahan intrakranial, dan laserasi korteks serebri. Cedera otak primer dapat dikatakan sebagai cedera difus apabila kerusakan yang bersifat menyeluruh pada otak. Cedera difus umumnya bersifat makroskopik yang mencakup kerusakan seluler pada hampir seluruh jaringan otak seperti *diffuse axonal injury* (DAI) dan *diffuse vascular injury* (DVI).⁸

2. Cedera Otak Sekunder

Cedera otak sekunder adalah cedera yang terjadi setelah trauma atau benturan awal dan merupakan akibat dari kerusakan primer. Cedera otak sekunder adalah serangkaian peristiwa baik biomekanik maupun mekanik yang dapat menyebabkan disfungsi neurologis dan berpengaruh terhadap derajat keparahan cedera. Beberapa kelainan yang dapat terjadi di antara lain hipoksia, hipotensi, edema serebral, herniasi jaringan otak, peningkatan tekanan intrakranial (TIK), hidrosefalus, dan fistula cairan serebrospinalis (CSS).⁸



2.1.4 Patofisiologi

2.1.4.1 Cedera Otak Primer

Patofisiologi dari COT dapat dibagi menjadi dua bagian besar yaitu cedera primer dan cedera sekunder. Cedera primer merujuk pada cedera mekanikal pertama yang terjadi di saat penderita mengalami COT seperti fraktur tulang tengkorak, DAI, dan kontusi. Cedera sekunder adalah serangkaian peristiwa akibat cedera primer yang dapat menyebabkan disfungsi neurologis dan berpengaruh terhadap prognosis dan derajat keparahan dari COT.⁸

Seperti yang sudah disinggung sebelumnya, cedera primer terdiri dari dua yaitu fokal dan difus. Skandse menyatakan bahwa kedua jenis cedera primer ini sering terjadi secara bersamaan terutama pada COT sedang-berat.³⁵ Pada cedera otak fokal terutama akibat trauma tumpul atau trauma penetrasi, cedera yang biasa terjadi adalah fraktur tulang tengkorak dan kontusio yang terlokalisir pada bagian inti (*core*) dari lokasi cedera.³⁶ Adanya nekrosis sel saraf dan glial akibat suplai darah yang berkurang di lokasi *core* ini dapat menyebabkan terjadinya hematoma dan pendarahan pada epidural, subdural, dan intraserebral pada lapisan yang terbatas.⁸ Pada cedera primer fokal, kontusio sekunder pada lokasi kontralateral dari sisi yang mengalami cedera dapat terjadi akibat adanya *rebound* dari otak



bertabrakan keras dengan tulang tengkorak.³⁶ Berbeda dengan otak fokal, cedera otak difus terjadi akibat gaya non-kontak berupa tatan atau perlambatan pergerakan badan yang sangat cepat

sehingga menyebabkan terjadinya cedera goresan (*shearing*) dan penarikan (*stretching*) dari jaringan serebral. Gaya tarikan yang kuat ini dapat mencederai akson, oligodendrosit, dan pembuluh darah sehingga menyebabkan edema otak dan iskemia jaringan otak.³⁷ Gambaran khas dari cedera otak difus adalah cedera pada akson yang dominan terdapat di subkortikal dan jaringan *white matter* pada batang otak dan korpus kalosum. Cedera otak difus ini dapat bertahan berbulan-bulan setelah terjadinya COT.³⁸

2.4.1.2 Cedera Otak Sekunder

Cedera otak sekunder adalah proses selular dan biokimia yang terjadi setelah cedera otak primer. Cedera otak sekunder ini bertanggung jawab dalam progresi dan tingkat keparahan penyakit neurologis. Proses cedera otak ini dapat berlangsung lama hingga menahun.⁸ Beberapa mekanisme yang diketahui terlibat dalam terjadinya cedera otak sekunder di antara lain *excitotoxicity*, disfungsi mitokondrial, stres oksidatif, peroksidasi lemak (*lipid*), *neuroinflammation*, degenerasi akson, dan apoptosis sel (gambar 2.1).^{8,39}

Patofisiologi cedera otak sekunder bermula dari kerusakan BBB dan sel saraf yang menyebabkan kebocoran asam amino neurotransmitter eksitatori dan menyebabkan *excitotoxicity*. Stimulasi berlebihan dari neurotransmitter eksitatori akan meningkatkan kadar ion kalsium intrasel



dan berujung pada berbagai fenomena yang semakin merusak jaringan otak seperti stres oksidatif hingga apoptosis sel.⁸

Excitotoxicity

Excitotoxicity berawal dari kerusakan pada *blood-brain barrier* (BBB) dan kematian sel saraf pada cedera primer yang menyebabkan banyaknya neurotransmitter eksitatori seperti glutamat dan aspartat yang keluar dari ujung saraf presinaps yang mengalami kematian tersebut.⁸ Selain kebocoran glutamat yang berlebih, studi juga menunjukkan adanya kegagalan dalam melakukan *reuptake* glutamat yang berlebih tersebut ke dalam sel saraf yang masih hidup. Studi pada sel astrosit manusia oleh Landeghem menunjukkan adanya penurunan ekspresi *sodium-dependent glutamate transporters* (GLAST) dan *glutamate transporter 1* (GLT-1) sebanyak 40% dalam 24 jam setelah terjadinya COT yang menyebabkan berkurangnya *reuptake* glutamat secara bermakna.⁴⁰ Peningkatan kadar asam amino neurotransmitter eksitatoris ini berakibat pada peningkatan aktivasi reseptor inotropik dan metabotropik. Beberapa reseptor yang masuk ke dalam kelompok reseptor inotropik glutamat antara lain *N-methyl-d-aspartate* (NMDA) dan *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate* (AMPA). Kedua reseptor ini apabila teraktivasi oleh ligannya akan menyebabkan aliran masuk ion Na⁺, K⁺, dan Ca²⁺ yang akan abkan depolarisasi membran saraf.⁸ Influx ion ini terutama Ca²⁺ stimulasi NMDA dapat meningkatkan jumlah ion Ca²⁺ intrasel yang



berujung pada aktivasi berbagai jalur molekular yang diperantarai oleh *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*, *mitogen activated protein kinases* (MAPK), dan *protein phosphatases*.^{41–43} Beberapa studi menunjukkan bahwa stimulasi NMDA akibat glutamat juga meningkatkan kadar *reactive oxygen species* (ROS) dan nitrit oksida (NO) sehingga ikut berperan dalam eksaserbasi cedera otak sekunder.⁴⁴ Berbeda dengan reseptor inotropik, reseptor glutamat metabotropik yang teraktivasi oleh ligananya (glutamat) akan mengaktivasi jalur *phospholipase C/inositol-1,4,5-triphosphate* yang menyebabkan pengeluaran ion Ca^{2+} dari gudang penyimpanannya di retikulum sarkoplasma. Aktivasi dari reseptor inotropik dan metabotropik glutamat akan menyebabkan *excitotoxicity* yang berujung pada peningkatan kadar ion Ca^{2+} di dalam sel saraf.⁴⁵ Peningkatan ion ini akan mengaktifkan berbagai jalur yang dapat menimbulkan disfungsi mitokondria, stres oksidatif, hingga apoptosis sel melalui aktivasi *calcineurin*, *calpain*, dan *caspases*.^{8,41–45}

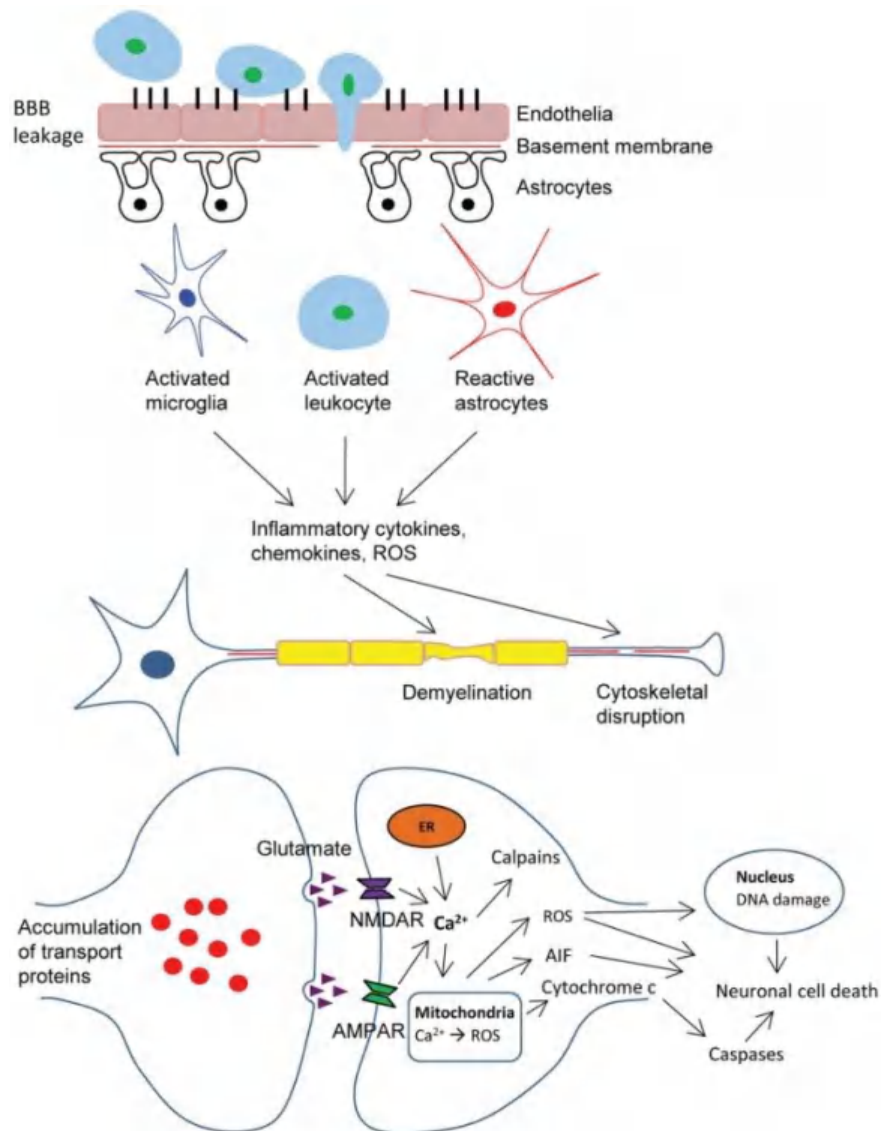
Disfungsi Mitokondria

Disfungsi mitokondria adalah proses yang merupakan pencetus dari hampir keseluruhan disregulasi metabolik dan fisiologis yang terjadi pada cedera otak sekunder. Peningkatan kadar ion Ca^{2+} intrasel akan meningkatkan aliran masuk dari ion tersebut ke dalam mitokondria

yang menyebabkan depolarisasi membran mitokondria, produksi ROS, penghambatan produksi *adenosine triphosphate* (ATP). Kondisi ini



menyebabkan rantai transfer elektron yang bertanggung jawab dalam produksi ATP secara oksidatif pada mitokondria terhenti dan rusak.⁸



Gambar 2 1. Patofisiologi dari cedera otak sekunder yang melibatkan kerusakan pada *blood-brain barrier* (BBB), inflamasi, stres oksidatif, dan *excitotoxicity*.³⁹



elain itu, beberapa studi juga menunjukkan adanya perubahan asi dan aktivasi beberapa protein membran mitokondria seperti

mitochondrial permeability transition pore (mPTP) yang meningkatkan permeabilitas dari mitokondria.⁴⁶ Semua proses tersebut akan berujung pada kerusakan struktur dan pembengkakan mitokondria akibat disregulasi osmolaritas mitokondria yang berujung pada kehancuran dari mitokondria tersebut.⁸ Hancurnya mitokondria akan menyebabkan terlepasnya berbagai protein mitokondria seperti *cytochrome c* dan *apoptosis-inducing factor* (AIF) ke sitoplasma yang menjadi salah satu pencetus terjadinya apoptosis sel.⁴⁷

***Reactive Oxygen Species* dan Peroksidasi Lemak**

Bukti-bukti penelitian menunjukkan bahwa patogenesis dan kerusakan yang terjadi setelah COT dapat terjadi salah satunya adalah melalui peningkatan stres oksidatif yang diperantarai oleh peningkatan *reactive oxygen species* (ROS). Produksi ROS setelah terjadinya COT dapat terjadi melalui berbagai jalur seperti melalui aktivitas enzim, peningkatan aktivitas neutrofil, *excitotoxicity*, dan disfungsi mitokondria.⁸ Stimulasi reseptor NMDA oleh glutamat yang berlebihan serta akumulasi ion Ca^{2+} yang terjadi akibat *excitotoxicity* diketahui dapat mengaktifkan enzim *nitric oxide synthases* (NOS) yang berperan dalam produksi nitrit oksida (NO).^{44,48} Reaksi antara ROS dan NO akan menghasilkan *peroxynitrite* (PN) yang dapat menyebabkan cedera oksidatif pada banyak struktur sel termasuk di



nya menyebabkan nitrasi protein dan kerusakan struktural *deoxyribonucleic acid* (DNA).⁴⁹ Proses yang sama juga terjadi pada

penyakit saraf kronis degeneratif seperti terbentuknya *lewy body* pada penderita demensia.⁵⁰ Molekul ROS lain selain PN seperti ion hidroksil radikal ($\text{OH}^\cdot$) dan superoksida ($\text{O}_2^\cdot$) juga diketahui dapat bereaksi dengan basa purin dan pirimidin dari DNA sehingga menyebabkan adanya perubahan struktur DNA dan mutasi genetik. Sebagai contoh, ion hidroksil radikal diketahui dapat bereaksi dengan basa *thymidine* dan membentuk *thymine glycol* atau *5-hydroxy-6-hydrothymine* yang tidak dapat membentuk ikatan ganda dengan basa pasangannya yaitu *adenine*.⁵¹

Selain pada protein dan DNA, ROS juga dapat bereaksi dengan molekul fosfolipid yang terdapat di membran plasma sel. Reaksi peroksidasi antara ROS dengan *unsaturated fatty acid* pada fosfolipid membran dapat membentuk *lipoperoxyl* radikal yang merusak struktur membran plasma dan meningkatkan permeabilitasnya. Kerusakan membran plasma pada mitokondria akan memperburuk kondisi disfungsi mitokondria yang sedang terjadi. Selain itu, kerusakan pada struktur membran plasma juga berakibat pada gangguan transpor ion dan memperburuk kondisi akumulasi ion Ca^{2+} pada sel. Maka dari itu dapat disimpulkan bahwa hubungan antara ROS, disfungsi mitokondria, dan *excitotoxicity* bersifat umpan balik positif dan saling menguatkan.⁸ Kerusakan yang terjadi melalui umpan balik positif tersebut dapat bersifat masif dan berkepanjangan. Ansari menunjukkan bahwa peningkatan kadar ROS dan peroksidasi membran plasma dapat



efek jangka panjang seperti penurunan plastisitas otak, aliran darah ke otak, dan immunosupresi.⁵²

Neuroinflammation

Proses inflamasi dapat terjadi di SSP setelah penderita mengalami COT. Pada masa akut kurang lebih 24 jam setelah COT, disfungsi dan gangguan permeabilitas pada BBB akan menyebabkan sel-sel imun seperti neutrofil, monosit, dan limfosit untuk masuk ke SSP menuju parenkim otak yang mengalami cedera. Sel darah putih dan imun tersebut akan memulai proses inflamasi melalui sekresi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6 dan TNF- α . Peningkatan ekspresi sitokin SSP yang berkepanjangan diasosiasikan dengan gangguan permeabilitas BBB, edema otak, dan defisit neurologis.^{8,53} Sitokin TNF- α juga dapat berikatan dengan protein *caspase* dan berperan penting dalam menyebabkan apoptosis sel.⁵³ Molekul kemokin seperti *C-X-C Motif Chemokine Ligand 8* (CXCL8) dan *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) juga ditemukan meningkat pada jaringan otak yang mengalami cedera. Kedua molekul kemokin ini berperan dalam membawa lebih banyak sel leukosit ke jaringan otak yang mengalami cedera sehingga memberikan efek umpan positif untuk terjadinya inflamasi.⁵³ Selain sel leukosit dan imun perifer, sel-sel glia pada otak seperti sel astrosit dan mikroglia juga dapat mengeluarkan sitokin proinflamasi sebagai respon dari terjadinya cedera. Walaupun hampir semua jenis sel dalam SSP seperti astrosit, oligodendroglia, sel endotel dan



a dapat mensekresikan sitokin proinflamasi sebagai respon dari sel mikroglia memainkan peran paling besar dalam proses

neuroinflamasi ini. Sebagai respon dari cedera, mikroglia akan mensekresikan sitokin proinflamasi, memfagosit debris seluler, dan memulai respon perbaikan sel saraf. Namun demikian sel mikroglia juga dapat mensekresikan sitokin tersebut dalam jumlah berlebih dan menyebabkan eksaserbasi cedera otak, mengganggu proses perbaikan jaringan otak, dan perbaikan status neurologis.⁵⁴

Sel-sel imun terutama sel imunitas bawaan seperti neutrofil, monosit, dan mikroglia berperan besar dalam proses terjadinya neuroinflamasi. Neutrofil merupakan populasi sel yang paling banyak ditemukan dalam sirkulasi setelah terjadinya cedera otak. Neutrofil adalah sel imun perifer pertama yang direkrut ke meninges dan parenkim otak yang mengalami cedera sebagai respons terhadap gradien chemokine (misalnya Interleukin 8/CXCL8). Molekul adesi endotel pembuluh darah seperti E-selectin dan ICAM1 juga mengalami peningkatan setelah cedera dan memfasilitasi perpindahan neutrofil ke parenkim otak yang rusak. Neutrofil akan menginfiltrasi jaringan luka dan mendominasi di dalam lingkungan lesi selama beberapa hari pertama. Kemudian, jumlah neutrofil berkurang dari hari ke-5 hingga ke-7 pasca cedera. Fungsi utama neutrofil adalah mengendalikan lesi cedera dan menghilangkan debris seluler. Namun, neutrofil juga dapat memperburuk cedera otak dengan efek toksik langsung dari *matrix metalloproteinases* (MMPs), *reactive oxygen species* (ROS),

γ , serta meningkatkan permeabilitas vaskular dan pembentukan Monosit merupakan leukosit yang berasal dari sumsum tulang dan



akan berdiferensiasi menjadi makrofag atau sel dendritik (DC) setelah menyerbu jaringan yang terluka. Mereka memiliki fungsi imun bawaan penting seperti fagositosis, pelepasan sitokin/chemokine, penyajian antigen, modulasi imun, dan perbaikan jaringan. Setelah COT, monosit masuk ke ruang perivaskular dan parenkim otak dalam waktu 1-2 hari, berdiferensiasi menjadi makrofag, dan dapat tinggal di otak selama beberapa minggu. Monosit darah direkrut ke otak yang terluka sebagai respons terhadap gradien kemokin lokal, misalnya *C-C motif chemokine ligand 2* (CCL2), yang ditemukan dalam cairan serebrospinal atau plasma penderita COT. Mikroglia adalah sel imun bawaan yang berada di SSP. Mereka bertindak sebagai pertahanan pertama dan memiliki fungsi penting dalam respons neuroinflamasi terhadap cedera otak akut. Mikroglia memiliki asal yang sama dengan monosit, berasal dari progenitor eritromieloid primitif selama embriogenesis dan mengekspresikan penanda umum seperti CD11b, IBA1, CD45, CD68, F4/80, CX3CR1. Setelah COT, mikroglia aktif dan berproliferasi di sekitar area cedera. Aktivasi mikroglia mengakibatkan perubahan morfologi dan fungsional, seperti perubahan pada ekspresi penanda permukaan, derajat pelepasan sitokin, dan peningkatan kemampuan fagositik. Mikroglia memiliki dua peran dalam neuroinflamasi pasca COT yaitu dapat memberikan efek sitoprotektif melalui sekresi faktor neurotropik, seperti *Neural growth factor* (NGF) dan

endothelial growth factor (VEGF). Selain itu, mikroglia dan juga memberikan efek sitotoksik melalui produksi ROS, NO, dan sitokin



proinflamasi.⁵⁵ Imunitas bawaan dapat terjadi dengan durasi hingga 4-7 hari setelah terjadinya COT.⁵⁶

Selain imunitas bawaan, cedera pada penderita COT juga dapat mengaktifkan imunitas adaptif. Pada saat terjadi COT, cedera pada jaringan otak dan kerusakan BBB akan menyebabkan antigen otak tersebar pada peredaran darah sistemik yang menyebabkan teraktivasinya imunitas adaptif yang terdiri dari imunitas dimediasi sel (*cell-mediated immunity*) oleh sel T dan imunitas humoral oleh sel B limfosit. Infiltrasi sel imunitas adaptif pada SSP terjadi setelah infiltrasi sel monosit.⁵⁵ Beberapa protein spesifik SSP seperti *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), *myelin basic protein* (MBP), *myelin oligodendrocytes glycoprotein* (MOG), and *myelin-associated glycopeptide* (MAG) akan menyebabkan reaksi imun karena dianggap sebagai antigen asing pada jaringan lain selain SSP, suatu peristiwa yang dinamakan autoimunitas.^{57–59} Antigen SSP yang tersebar pada sirkulasi sistemik tersebut dapat difagositosis dan dipresentasikan pada sel *antigen presenting cell* (APC) yang kemudian akan mengaktifkan sel T-*helper* yang kemudian akan mengaktifkan sel T- sitotoksik dan sel B. Sel limfosit yang teraktivasi tersebut kemudian akan menginfiltrasi jaringan otak yang mengalami cedera melalui BBB. Walau demikian, temuan penelitian sampai saat ini masih bervariasi mengenai apakah autoimunitas ini bersifat mencederai atau mendukung proses penyembuhan penderita COT.

yang bervariasi ini disebabkan oleh berbagai luasnya jaras adaptif dengan tiap jaras spesifik yang melibatkan *subset* populasi



sel T yang berbeda akan memberikan luaran yang berbeda pula.⁵⁵ Salah satu temuan yang mendukung efek protektif aktivasi sel T adalah penelitian oleh Moalem. Pada penelitian ini, paparan sel T pada molekul MPB mengurangi derajat cedera sekunder pada model tikus yang mengalami cedera saraf optik.⁶⁰ Temuan efek protektif juga dilaporkan oleh Hofstetter pada penelitiannya yang menunjukkan adanya efek protektif sel T yang teraktivasi oleh protein myelin pada model tikus dengan cedera otak dan saraf spinal.⁶¹ Walau demikian, terdapat juga studi yang menunjukkan efek perburukan cedera otak akibat aktivasi sel T oleh antigen SSP. Daglas dalam penelitian eksperimentalnya melaporkan bahwa sel T CD8+ yang teraktivasi oleh sel Th17 dapat menyebabkan neurodegenerasi yang menyebabkan perburukan cedera sel saraf, patologi myelin, dan disfungsi saraf beberapa bulan setelah cedera pada model tikus yang mengalami cedera kortikal.⁶²

Degenerasi Akson

Degenerasi akson dapat terjadi segera setelah seseorang mengalami COT. Degenerasi yang terjadi dinamakan *Wallerian degeneration* yaitu proses degenerasi akson secara retrograde yang terjadi dari ujung distal akson saraf. *Wallerian degeneration* dapat terjadi beberapa menit setelah COT sebagai akibat cedera mekanis yang menyebabkan disorganisasi



akson yang terdiri dari jaringan longitudinal dari neurofilamen dan mikrotubul.⁶³ Kerusakan sitoskeleton ini yang dikombinasikan dengan

kerusakan akibat *excitotoxicity*, peningkatan ion Ca^{2+} intrasel, dan ROS dapat menyebabkan DAI dalam hitungan hari hingga bulan dengan gambaran berupa degradasi myelin, gangguan transport akson, dan akumulasi vesikel transport akson di ujung sinaps. Kerusakan sitoskeleton pada ujung sinaps dapat menyebabkan *retraction bulbs* yang dapat merusak hubungan antar sel saraf. Terbentuknya *retraction bulb* dan penumpukan vesikel transport ini dapat berujung pada kematian sel saraf dan oligodendrosit.⁸ *Retraction bulb* banyak ditemukan pada *corpus callosum* dan traktus piramida di batang otak. Hellewell melaporkan adanya hubungan antara kerusakan akson pada *corpus callosum* dengan infiltrasi sel inflamasi (mikroglia dan makrofag) yang dapat menyebabkan gangguan pembuluh darah, degradasi akson, cedera pada oligodendrosit, dan deformasi *white matter*.⁶⁴

Apoptosis Sel

Apoptosis dari sel saraf dan oligodendrosit adalah gambaran utama dari cedera otak sekunder. Apoptosis terjadi akibat aktivasi *cysteine proteinase* seperti *caspase* dan *calpain* serta akibat dari interaksi antara jaras neurokimia, selular, dan molekular seperti *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), p38 MAPK, dan *janus kinase/signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT). Jaras apoptosis melalui *caspase* dapat

n melalui jaras ekstrinsik dari reseptor kematian sel atau jaras



intrinsik melalui mitokondria. Jaras ekstrinsik dapat terjadi melalui interaksi antara TNF atau Fas dengan reseptornya.

Jaras intrinsik terjadi akibat kebocoran *cytochrome c* sebagai akibat dari depolarisasi dan gangguan permeabilitas membran mitokondria. *Cytochrome c* dapat berinteraksi dengan *apoptotic activating protein-1* di sitosol yang dapat mengaktifkan *caspase 8* dan *caspase 9* dan berujung pada pemotongan dan aktivasi *caspase 3*.⁸ Protein *caspase 3* yang teraktivasi dapat menginduksi terjadinya kondensasi kromatin, fragmentasi DNA, pembentukan *blebbing* (*bulging* membran plasma keluar membentuk vesikel vesikel besar), dan berujung pada kematian sel yang terkendali.⁶⁵ Apoptosis juga dapat terjadi melalui jaras lain yang tidak melibatkan *caspase* seperti proteolisis sitoskeleton dan terlepasnya protein mitokondria lain seperti AIF, *poly (ADP-ribose) polymerase-1*, dan *endonuclease G* yang dapat bermigrasi ke inti sel dan menyebabkan kondensasi kromatin dan fragmentasi DNA.⁸

Edema serebri

Edema pada jaringan saraf pusat terutama pada serebrum dapat terjadi setelah COT akibat dari perkembangan inflamasi yang terjadi pasca trauma. Edema serebri didefinisikan sebagai peningkatan komposisi air di



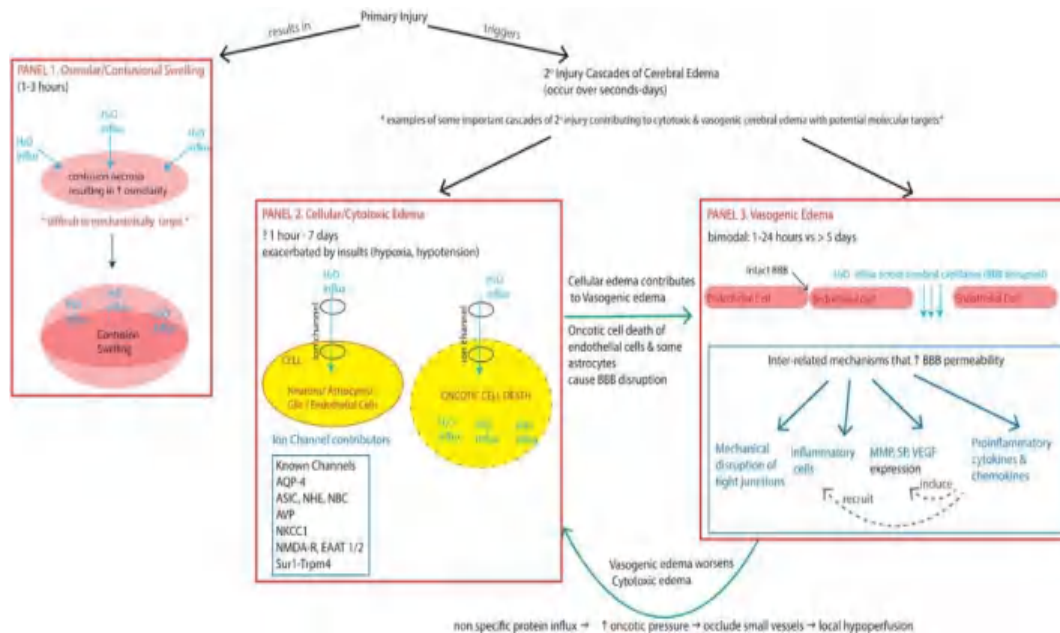
otak baik didalam sel maupun di jaringan interstitial. Edema serebri ingkatan tekanan intrakranial dapat terjadi dalam 24-48 jam pasca

trauma/jejas dan mencapai titik maksimalnya dalam 3-5 hari setelah pajanan.⁶⁶ Pada pasien dengan COT, keberadaan edema serebri dan peningkatan tekanan intrakranial diasosiasikan dengan prognosis yang buruk. Hubungan antara tekanan intrakranial dan keluaran pasien COT sangat penting sehingga monitoring tekanan intrakranial sudah menjadi salah satu fokus pada panduan manajemen pasien COT.⁶⁷ Hubungan antara peningkatan tekanan intrakranial dengan keluaran COT yang buruk salah satunya ditunjukkan oleh studi kohort retrospektif multisenter yang dilakukan oleh Iaccario pada tahun 2014. Dalam studi ini, analisis multivariat menunjukkan bahwa prediktor keluaran COT yang buruk salah satunya adalah peningkatan pergeseran garis tengah otak pada CT-scan.⁶⁸

Patofisiologi dari edema serebri terjadi dalam dua tahapan (gambar 2.2). Pada tahapan pertama, yaitu 1-3 jam setelah terjadinya cedera, terjadi proses pembengkakan jaringan secara osmolar. Pada lokasi lesi, pusat dari jejas akan memiliki osmolaritas yang lebih tinggi sehingga menarik air menuju pusat lesi. Tahapan kedua terjadi pada 1 jam hingga 7 hari setelah cedera dan terbagi menjadi dua proses yaitu edema selular/sitotoksik dan edema vasogenik.⁶⁹ Edema sitotoksik terjadi akibat kegagalan pompa ion atau teraktivasi beberapa kanal ion yang menyebabkan hilangnya gradien konsentrasi ion dan menyebabkan terjadinya aliran air dari ruangan interstisial menuju ke dalam sel. Apabila tidak terkoreksi, masuknya air ke dalam ruangan intraseluler dapat menyebabkan kematian



sel.⁶⁹ Masuknya air ke dalam sel tidak menambah total cairan jaringan otak karena hanya merupakan proses redistribusi air.



Gambar 2 2. Patofisiologi edema serebri

Namun, berkurangnya air di ruangan interstitial dapat memicu terjadinya osmosis air dari luar terutama dari pembuluh darah dan sistem limfatik sehingga meningkatkan total kandungan air jaringan.^{69,70} Edema vasogenik terjadi akibat meningkatnya kebocoran cairan didalam pembuluh darah menuju cairan interstitial. Pada pasien COT, edema vasogenik terjadi terutama akibat kerusakan BBB dan neuroinflamasi yang meningkatkan permeabilitas pembuluh darah.⁶⁹



2.2 Umbilical Cord-mesenchymal Stem Cell (UC-MSC) dan Secretome

2.2.1 Definisi

UC-MSC adalah sel punca yang berasal dari mesoderm embrionik yang terletak di tali pusar selama perkembangan janin. Tali pusar adalah salah satu sumber sel MSC yang paling banyak digunakan dalam penelitian mengenai *stem cell*. Tali pusar berfungsi sebagai penghubung antara janin yang sedang tumbuh dan sirkulasi darah ibu orang tua. Memiliki panjang rata-rata sekitar 50 cm dan diameter 1-2 cm, serta memiliki selubung dan dua arteri dengan panjang diameter rata-rata 7-8 dan 3-4 mm. Di sekitar pembuluh darah ini, terdapat tempat konsentrasi tertinggi MSC diisolasi menurut kelompok ilmiah riset, yang disebut *Wharton's Jelly*.⁷¹ Selain itu, MSC bukan satu-satunya jenis sel punca yang dapat diisolasi di sini, karena sel punca hematopoietik (HSC) biasanya juga ditemukan. MSC dapat didistribusikan ke berbagai jaringan dan sel somatik dan rangkaian berikut akan terbatas pada berbagai bagian yang berbeda dari jaringan ikat dewasa serta sumsum tulang.

Terdapat beberapa aspek keunggulan dalam penggunaan sel MSC yang diperoleh dari tali pusar, atau UC-MSC, jika dibandingkan dengan sel MSC yang berasal dari sumber lain. Salah satu aspek yang paling menonjol dari UC-MSC adalah metode pengambilan sel yang bersifat non-invasif.



onteks ini, pengambilan sel MSC dari tali pusar dilakukan dengan
ng sangat mudah dan tanpa melukai, yang meminimalisir risiko

cedera bagi ibu atau bayi yang masih dalam kandungan. Hal ini berbeda dengan metode pengambilan sel MSC dari sumber lain yang bisa lebih invasif. Proses isolasi sel UC-MSC lebih spesifik, mengambil bagian dari jaringan *Wharton's Jelly* pada tali pusar, yang merupakan jaringan sel kuboid yang kaya dengan sel MSC dan merupakan komponen dominan dalam struktur tali pusar.^{12,13} Sel UC-MSC juga telah terbukti memiliki tingkat proliferasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan tipe sel MSC lainnya. Ini berarti bahwa sel UC-MSC memiliki potensi untuk berkembang dan memperbanyak diri dalam tingkat yang lebih cepat dan efisien, yang bisa menjadi keuntungan penting dalam konteks terapi regeneratif. Keuntungan lain dari sel UC-MSC adalah imunogenitasnya yang rendah. Ini berarti bahwa sel-sel ini cenderung menimbulkan respon inflamasi yang lebih kecil jika dibandingkan dengan sel MSC dari sumber lain saat diberikan ke penderita. Dengan demikian, penggunaan sel UC-MSC dapat mengurangi risiko reaksi inflamasi atau penolakan setelah transplantasi sel. Sel UC-MSC juga memiliki kemampuan sekresi faktor secara parakrin yang disebut *secretome*, yang memiliki berbagai efek positif, khususnya dalam konteks regenerasi jaringan yang cedera. *Secretome* adalah kumpulan molekul yang disekresikan oleh sel dan memiliki berbagai efek biologis, termasuk stimulasi regenerasi dan perbaikan jaringan.^{14,15}

Berbagai tantangan muncul dalam implementasi UC-MSC sebagai untuk COT, dan mengatasi tantangan-tantangan ini merupakan krusial dalam proses pengembangan terapi ini. Standardisasi



produksi *secretome* UC-MSC menempati posisi utama dalam daftar tantangan ini, di mana proses produksi harus dilakukan dengan ketat dan konsisten, memastikan kualitas yang optimal. Ini melibatkan penciptaan lingkungan kerja yang steril dan stabil, yang akan meminimalisir risiko kontaminasi dan pengaruh eksternal yang berpotensi merusak kualitas *secretome*. Sementara itu, pengembangan strategi pengiriman yang efisien dan efektif juga menjadi masalah penting yang harus diatasi. Metode pengiriman yang dirancang dengan baik akan memaksimalkan efisiensi terapi dan meminimalkan potensi efek samping, sehingga menjadi bagian kunci dari proses ini. Selain itu, tantangan berikutnya adalah mendesain dan melaksanakan uji klinis yang efektif, untuk memverifikasi keamanan dan efektivitas *secretome* UC-MSC dalam terapi COT. Uji klinis ini harus dirancang dengan standar tinggi dan melibatkan jumlah partisipan yang signifikan, untuk memastikan hasil yang valid dan akurat. Akhirnya, tantangan lainnya adalah pemahaman yang masih terbatas tentang mekanisme kerja *secretome* UC-MSC. Meskipun *secretome* UC-MSC telah terbukti memiliki potensi regeneratif terhadap sel-sel otak yang rusak, mekanisme pasti di balik efek ini masih belum sepenuhnya dipahami. Meningkatkan pemahaman ini akan sangat penting untuk memaksimalkan potensi terapi *secretome* UC-MSC dan membantu dalam mengatasi tantangan lain yang mungkin muncul dalam proses pengembangan terapi



2.2.2 Peranan UC-MSC Sebagai *Multilineage Differentiation* dan *Drug Delivery Vector*

Kemampuan ekstensif diferensiasi sel punca mesenkimal *multilineage*, ditambah dengan aksesnya sendiri dari berbagai sumber yang berbeda seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, jaringan tali pusar, ligamen periodontal, pulpa gigi, dan cairan menstruasi, meningkatkan minat baru-baru ini dalam menggunakan MSC dalam baik uji pra-klinis maupun uji klinis untuk mengobati penyakit lain. Dari semua sumber, MSC yang berasal dari UC telah terbukti memiliki konsentrat paling banyak, mudah diakses dibandingkan dengan MSC dari sumsum tulang, dan rentan terhadap rangsangan spesifik yang dapat menimbulkan diferensiasi multipoten di dalam sel induk. Menurut studi oleh Visweswaran MSC ditunjukkan memiliki bukti eksperimental yang kuat dari kemampuan diferensiasi *multilineage*, karena mampu berdiferensiasi ke ketiga lapisan germinal, mesoderm, ektoderm, dan endoderm, dan tidak terbatas pada garis keturunan mesenkimnya sendiri.⁷² Potensi diferensiasi ini tampaknya terkait dengan pemanfaatan MSC dari jalur transduksi sinyal yang disebut persinyalan Wnt dan merupakan mekanisme kunci dalam memunculkan diferensiasi *multilineage* dalam MSC, melalui interaksinya satu sama lain.⁷³

Efektifitas pemberian agen terapeutik kedalam tubuh banyak sekali



tantangan tersendiri seperti jangka waktu efektifitasnya yang kelarutan yang buruk, agen yang terlalu cepat dikeluarkan dari tubuh melalui sistem ekskresi, kemampuan menarget yang buruk,

dan efek samping toksisitas pada jaringan yang sehat. Untuk membuat agen terapeutik dapat sampai ke tempat tujuannya dengan akurat dan tetap mempertahankan efektivitasnya, agen tersebut memerlukan mekanisme yang memungkinkan agen dikirim ke jaringan tujuan dengan aman dan tepat sasaran. Pemberian obat/agen dengan sel MSC menjadi salah satu cara untuk hal ini. Karena sifatnya yang biologis dan cenderung bersifat *inert* terhadap sistem imun, sel MSC tidak menjadi target ketat untuk sistem imun pasien penerima pengobatan. Selain itu, sel MSC secara alami, akibat reseptor-reseptor di permukaannya, akan bermigrasi menuju tempat dengan cedera atau inflamasi. Sel ini juga mudah diberikan pada pasien melalui berbagai cara seperti injeksi sistemik dan pemberian topikal.⁷⁴

Pemberian obat menggunakan sel MSC dapat dilakukan dengan beberapa strategi salah satunya adalah *passive drug loading*. Metode ini menggunakan konsep gradien konsentrasi antara lingkungan internal sel dengan jaringan eksternal pasien. Walaupun metode ini terkesan mudah, namun beberapa hal detail seperti status hidrofobik suatu agen harus diperhatikan. Selain itu metode gradien konsentrasi ini juga berisiko menyebabkan obat/agen dikeluarkan dari sel MSC sebelum menuju lokasi yang dituju. Metode kedua adalah *protein-mediated drug loading*. Dengan mempelajari berbagai jenis reseptor yang ada di permukaan sel MSC maupun yang termasuk kedalam sistem vesikel ekstraselular/*secretome*

obat atau agen dapat didesain khusus agar dapat menempel pada reseptor spesifik yang ada di dalam MSC. Dengan menggunakan



metode ini, terutama untuk reseptor membran yang terlibat dalam sistem *secretome* sel MSC, waktu pelepasan obat dari sel MSC dapat diatur sedemikian rupa mengikuti sistem fisiologis reseptor sel MSC tempat obat itu menempel. Beberapa metode lain yang dapat digunakan antara lain metode elektroporasi dan transfeksi *liposome-based* namun metode ini cenderung “agresif” dan berisiko mengurangi kesintasan sel MSC di dalam tubuh pasien.⁷⁴

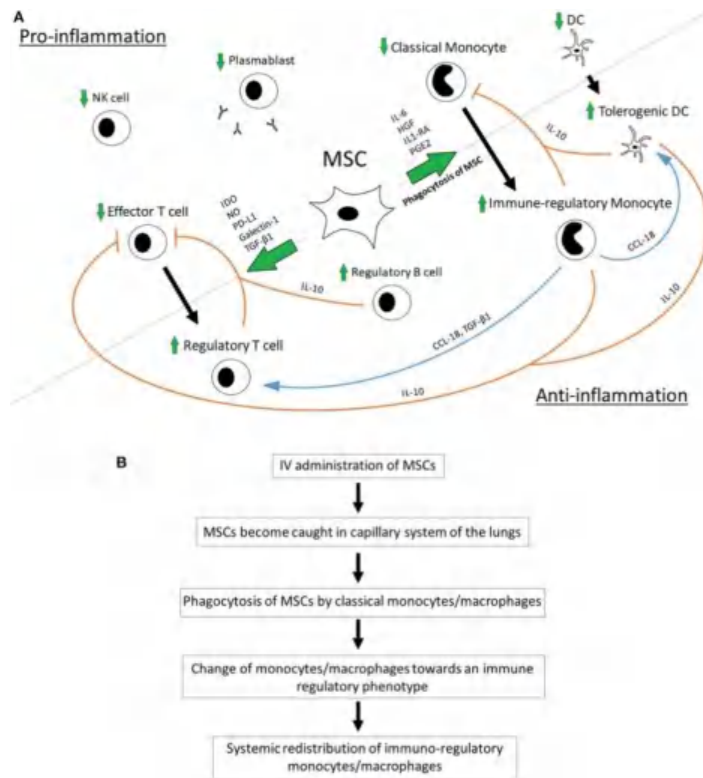
Penggunaan sel MSC sebagai tata laksana berbasis sel punca sangat besar. Selain sebagai modalitas untuk membawa agen eksternal spesifik menuju jaringan yang diinginkan, sel MSC sendiri merupakan sel aktif yang dapat mensekresikan banyak faktor yang tergabung dalam suatu kumpulan senyawa sekresi yang disebut sebagai *secretome*. Sel MSC mampu mensekresikan berbagai senyawa yang memiliki efek tropik seperti *growth factor* maupun senyawa yang mampu memodulasi inflamasi, baik proinflamasi maupun anti inflamasi. Kemampuan anti inflamasi dari sel MSC berpotensi untuk digunakan sebagai terapi karena mampu mencegah kerusakan jaringan dan menstimulasi pertumbuhan jaringan baru. Konsep sel MSC yang memiliki banyak jenis senyawa sekresi dinamakan konsep *drug store*. Kemampuan ini memiliki banyak potensi medis salah satunya di bidang cedera otak.^{17,75}



:-MSC, *Secretome*, dan Fungsinya Sebagai Imunomodulator

Dalam hal bertindak sebagai imunomodulator, penelitian terbaru menunjukkan bahwa sel MSC menunjukkan kemampuan fungsional sebagai pusat kendali untuk sebagian besar faktor inflamasi dan sel imun seperti monosit/makrofag, sel T, sel B, sel dendritik, T *regulatory* (Treg) dan sel *natural killer* (sel NK). Khususnya, untuk Treg dan makrofag, interaksi dengan MSC menyebabkan interaksi kompleks yang mengkatalisasi yang menyebabkan kedua potensi imunomodulator terbuka.⁷⁶ Penyebab interaksi ini sering disarankan untuk dikaitkan dengan *secretome* MSC yang terdiri dari berbagai faktor persinyalan seperti eksosom atau sitokin, meskipun ada juga bukti yang menunjukkan interaksi sel-sel sebagai mekanisme yang digunakan MSC untuk memediasi sebagai imunomodulator. Saat ini, lebih banyak penelitian mengenai kemampuan imunomodulator MSC masih dieksplorasi seperti terhadap MSC yang mengalami apoptosis, tidak aktif secara metabolik, atau bahkan terfragmentasi. Penelitian lebih lanjut di bidang ini akan dapat memperluas pemahaman tentang kontribusi potensial MSC hidup terhadap tumorigenesis, atau opsi untuk memanfaatkan sel dan fragmen mati sebagai alternatif untuk eksperimen.¹⁷





Gambar 2 3. Mekanisme UC-MSC sebagai imunomodulator.¹⁷

2.2.4 Peran UC-MSC dan *Secretome* dalam Cedera Otak Traumatik

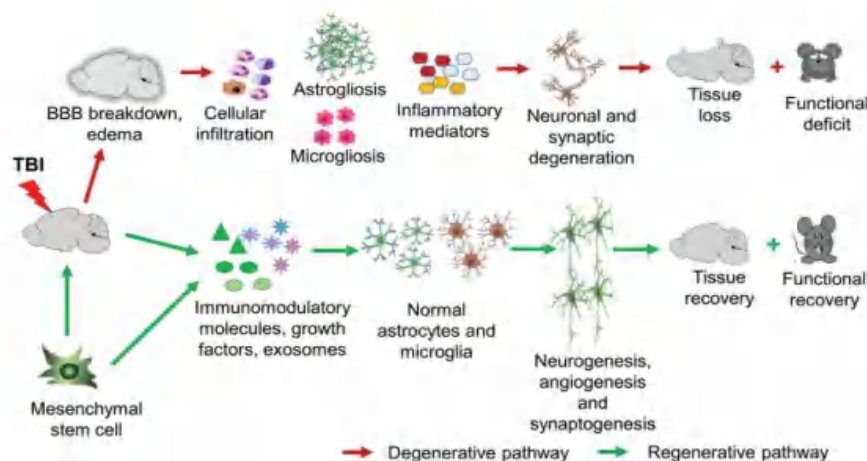
2.2.4.1 Peran UC-MSC

UC-MSC sudah banyak dilirik dan diuji dalam studi cedera otak sebagai terapi sel induk guna mengobati cedera otak. Das melaporkan bahwa metode pemberian UC-MSC yang paling menguntungkan dan efisien untuk otak adalah melalui pemberian intrakranial (ICV) dan intravena (IV) apabila



praktik klinis. Rute pemberian secara intranasal juga dapat digunakan terutama karena pemberian menggunakan metode ini

bersifat *non-invasive*.¹⁶ Sel-sel UC-MSC yang diberikan melalui intranasal akan bergerak melalui mukosa hidung, menembus lempeng cribriform, dan menuju parenkim otak melalui jalur saraf olfaktori dan dapat juga memasuki CSF sebelum masuk ke korteks dan parenkim otak.⁷⁷ Pemberian UC-MSC pada penderita dengan cedera otak terbukti memberikan luaran klinis yang lebih baik. Penderita dalam keadaan vegetatif mampu kembali memiliki kemampuan motoris apabila diberikan UC-MSC dalam 1,3 – 1,5 bulan setelah onset.¹⁶



Gambar 2 4. Mekanisme MSC di dalam otak setelah terjadi cedera otak.¹⁶

Perihal dosis yang diperlukan, pemberian UC-MSC dalam jumlah terlalu banyak tidak selalu memberikan hasil yang diinginkan. Wu melakukan penelitian yang melaporkan bahwa infus 1×10^6 sel MSC memberikan luaran yang baik untuk pengobatan. Disisi lain, pemberian banyak 3×10^6 sel tidak memberikan efek yang lebih baik secara signifikan.⁷⁸ Hal ini dapat dijelaskan oleh laporan penelitian Danielyan yang



menunjukkan bahwa sebagian UC-MSC yang diberikan secara intranasal sebagian besar sel menetap pada bulbus olfaktorius dan hanya sebagian kecil saja yang masuk ke dalam korteks serebri dalam 1 jam setelah pemberian.⁷⁹

Terdapat beberapa mekanisme bagaimana pemberian UC-MSC pada otak yang mengalami COT dapat memiliki luaran klinis yang lebih baik (gambar 2.3). Pada kondisi normal, proses patofisiologi cedera otak sekunder pasca COT akan menyebabkan kerusakan BBB, infiltrasi sel-sel imun perifer, dan akan menyebabkan inflamasi yang berlebihan di otak yang berujung pada degenerasi sel-sel saraf dan sinaps dan defisit neurologis. Apabila penderita diberikan UC-MSC, efek imunomodulator yang didapat dari *secretome* sel ini akan menekan proses inflamasi berlebih yang terjadi pada cedera otak sekunder. Penekanan inflamasi ini akan mencegah terjadinya degenerasi sel-sel saraf dan defisit neurologis.^{16,17}

2.2.4.2 Peran *Secretome*

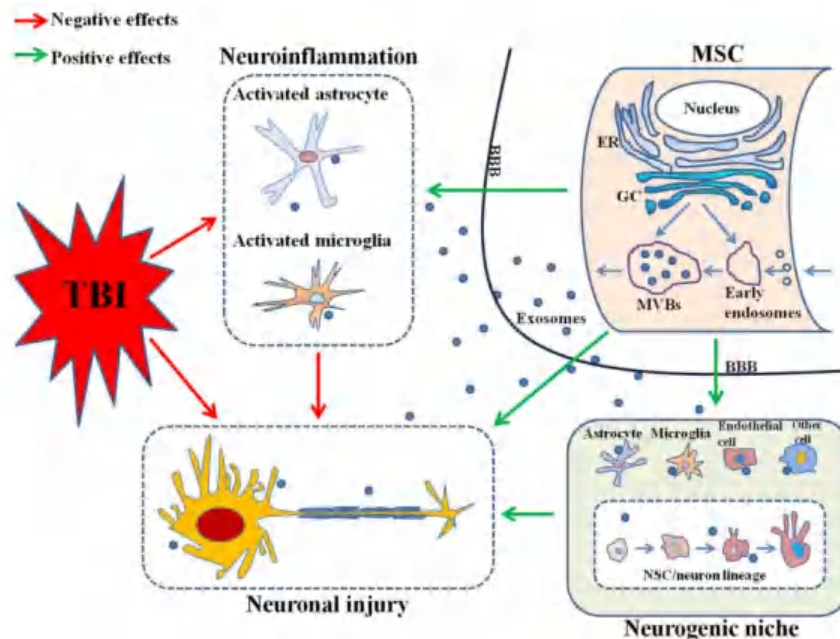
Dalam menjalankan fungsinya, UC-MSC banyak mengandalkan *secretome* yang merupakan kumpulan segala sesuatu yang disekresikan oleh sel UC-MSC. Dengan menggunakan *secretome* peneliti dapat melakukan penelitian efek sel ini terhadap patofisiologi COT secara *cell-free* atau tanpa

an sel UC-MSC itu sendiri.¹⁸ *Secretome* didefinisikan sebagai ikel membran plasma endositik dengan ukuran berkisar antara 30 m yang terbentuk dari sistem penyortiran vesikel oleh retikulum



endoplasma sel. Vesikel ini dapat berisi berbagai macam komponen seperti lipid, protein, hingga kode genetik *messenger ribonucleic acid* (mRNA) dan *micro RNA* (miRNA).¹⁸ Komponen protein *secretome* diketahui memiliki komponen protein yang sangat bervariasi mulai dari *heat shock protein* (HSP), protein yang digunakan untuk transportasi dan fusi membran, protein sitoskeleton (aktin, miosin), protein yang berperan dalam transduksi sinyal (protein kinase), enzim metabolik seperti *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GADPH) dan *aldolase*.^{80,81} Komponen lipid pada *secretome* tersusun dari membran plasma *lipid bilayer* dan komponen lemak lain yang terbenam di dalam membran plasma seperti *sphingomyelin* dan *glycerophospholipid*. Komponen materi genetik terdiri dari mRNA dan miRNA. Materi genetik mRNA dapat ditranslasikan menjadi protein atau tidak ditranslasikan namun memainkan peran sebagai regulator beberapa fungsi sel. miRNA memiliki fungsi utama menghambat ekspresi gen target melalui inhibisi translasi mRNA suatu gen. miRNA memiliki target berupa *untranslated region* (UTR) di ujung 3' basa genetik. Peran *secretome* dalam memodulasi fungsi target yang mencakup perubahan fisiologis, proliferasi, diferensiasi, dan kesintasan selnya diperankan terutama melalui efek inhibisi gen oleh miRNA ini.^{18,82}





Gambar 2 5. Efek *secretome* pada patofisiologi COT.¹⁸

Mekanisme bagaimana *secretome* dapat mengurangi efek negatif dari COT terdapat pada gambar 2.4. Efek utama *secretome* terhadap patofisiologi COT adalah melalui modulasi neuroinflamasi, menstimulasi neurogenesis, dan angiogenesis. Selain itu, *secretome* juga diketahui dapat memperbaiki kemampuan spasial dan mempercepat laju penyembuhan pada hewan maupun manusia.¹⁸ Efek inhibisi neuroinflamasi dari *secretome* sudah dibuktikan oleh beberapa studi yang dilakukan di tikus. Zhang dalam studinya menunjukkan bahwa pemberian *secretome cell-free* dalam 24 jam pasca cedera di tikus dapat menghambat aktivasi sel astrosit

dan mikroglia/makrofag CD68+ secara bermakna dibandingkan kontrol yang digunakan yaitu *liposome*. Kedua sel tersebut adalah berperan dalam inisiasi dan progresi neuroinflamasi pada COT



melalui sekresi sitokin proinflamasi.⁸³ Temuan yang sama juga dilaporkan oleh Cui yang menunjukkan adanya inhibisi aktivasi mikroglia dan astrosit setelah pemberian *secretome* UC-MSC yang dilihat dari pemeriksaan imunohistokimia dibandingkan dengan kontrol *sham*.⁸⁴ *Secretome* juga diketahui dapat mengurangi aktivasi makrofag yang dimodulasi salah satunya adalah melalui miRNA yang terkandung di dalamnya.⁸⁵ Efek neurogenesis oleh *secretome* pada COT dibagi menjadi dua yaitu neurogenesis secara umum dan khusus (*neurogenic niche*). Neurogenesis *neurogenic niche* hanya terjadi pada dua area yaitu area subgranular pada *dentate gyrus* di hipokampus dan area subventrikular di ventrikel lateral. Kedua lokasi tersebut unik dan memiliki lingkungan mikro yang berbeda karena mengandung banyak sel seperti sel glial, dan *neural stem cell* (NSC).¹⁸

Walaupun secara spesifik belum diketahui secara pasti, beberapa bukti tidak langsung menunjukkan bahwa *secretome* terutama kandungan miRNA di dalamnya berperan dalam *neurogenic niche*. Bukti pertama adalah NSC yang dalam beberapa studi diketahui merupakan target dari *secretome*. Bukti kedua adalah beberapa komponen yang dikeluarkan oleh sel *niche* juga merupakan komponen dari *secretome*. Pada neurogenesis, mekanisme bagaimana *secretome* dapat memicu terjadinya perbaikan cedera sel saraf juga belum sepenuhnya diketahui. Namun, banyak studi



menunjukkan bahwa beberapa komponen miRNA yang termasuk dalam

jaras neurogenesis seperti miR-let7b, miR-9, miR-124, dan miR-128 juga terkandung di dalam *secretome*.¹⁸

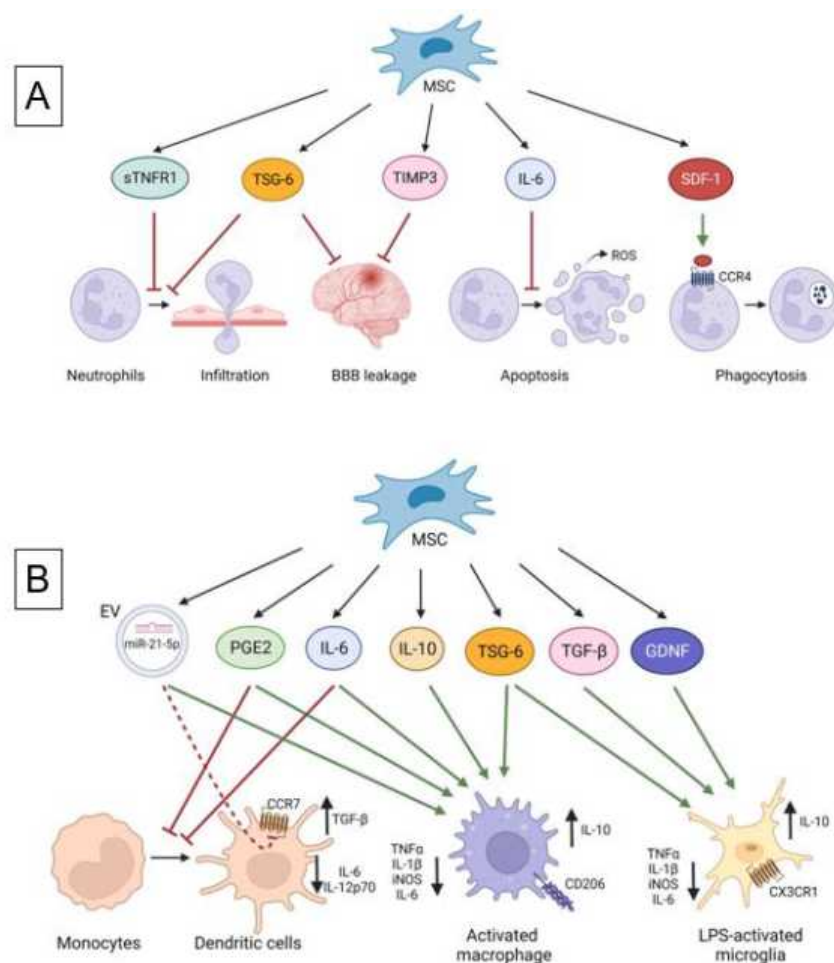
Peran Secretome dalam Modulasi Respon Imun

Peran sel MSC dalam memodulasi respon imun pada kasus COT sangat besar terutama pada sel imun bawaan neutrofil dan sel imun myeloid (gambar 2.5) Sel MSC mengeluarkan berbagai senyawa yang menghambat proses inflamasi oleh sel neutrofil di berbagai tahapan (gambar 2.5A). Sel neutrofil diketahui merupakan sel imun perifer yang paling banyak terdapat di lokasi cedera otak. Sel ini walaupun berperan positif dalam mencegah penyebaran cedera dan mengangkat debris jaringan, dapat bersifat toxic akibat efek inflamasi berkepanjangan yang berujung pada gangguan proses penyembuhan cedera dan fungsi saraf.⁵⁵ Sel MSC melalui sekresi *serum soluble tumor necrosis factor receptor 1* (sTNRF1) dan *Tumor necrosis factor-inducible gene 6* (TSG-6) berperan dalam mengurangi aktivitas dan migrasi sel neutrofil menuju jaringan cedera otak. Selain itu, neutrofil juga diketahui berperan dalam proses kerusakan BBB di awal patogenesis cedera otak sekunder melalui aktivasi *matrix metalloproteinase* (MMP) dan sekresi *reactive oxygen species* (ROS).⁸⁶ Sel MSC diketahui mensekresikan *Tissue inhibitor of metalloproteinase 3* (TIMP3) yang diketahui mengurangi aktivitas MMP neutrofil dan menjaga integritas BBB.⁵⁵



i ROS oleh sel neutrofil melalui proses apoptosis juga diketahui
ig setelah pemberian sel MSC atau *secretome*-nya melalui sitokin

IL-6. Hal ini ditunjukkan oleh studi Raffagelo yang mendemonstrasikan adanya penurunan fungsi protektif *secretome* saat model dilakukan *pre-treatment* dengan menggunakan antibodi monoklonal untuk IL-6 yang bersifat menghilangkan fungsi dari IL-6 tersebut.⁸⁷ Sel MSC juga diketahui ikut berperan dalam sekresi SDF-1 yang dapat meregulasi aktivitas fagositosis neutrofil pada model tikus sepsis.^{55,88}



Gambar 2 6. Efek imunomodulasi oleh *secretome* sel MSC pada sel neutrofil; B) pada sel myeloid.⁵⁵



Efek imunomodulasi oleh MSC dan *secretome* juga diamati oleh sel myeloid terutama sel monosit (gambar 2.5B). Sel monosit dapat berdiferensiasi menjadi sel dendritik atau sel makrofag setelah menginvasi jaringan luka. Infiltrasi monosit dikaitkan dengan derajat inflamasi yang lebih tinggi dan luaran penderita COT yang lebih buruk.⁵⁵ Inhibisi infiltrasi sel monosit diketahui dapat mengurangi volume cedera jaringan dan meningkatkan perbaikan luaran penderita COT. Hal ini ditunjukkan oleh studi Semple yang menunjukkan adanya pengurangan volume lesi otak pada tikus model yang dilakukan *knockout* gen CCL2 untuk mendemonstrasikan aktivitas makrofag yang berkurang. Tikus dengan gen *knockout* juga dilaporkan memiliki efek perbaikan motoris jangka panjang yang lebih baik dibandingkan tikus kontrol yang tidak dilakukan intervensi berupa inhibisi aktivitas makrofag.⁸⁹ Salah satu senyawa yang disekresikan oleh MSC dengan efek modulasi aktivitas monosit/makrofag adalah prostaglandin E2 (PGE2). Fungsi utama dari PGE2 dalam efek terapeutik MSC adalah efek inhibisi dari PGE2 terhadap induksi perubahan fenotip monosit menjadi sel dendritik atau makrofag.⁵⁵ Selain itu, PGE2 juga memiliki efek diferensiasi sel monosit klasik yang memiliki sifat proinflamasi menjadi monosit non-klasik yang memiliki sifat regulasi inflamasi.⁹⁰ Komponen *secretome* lain yang berperan dalam modulasi sel monosit di antara lain adalah IL-6, IL-10, dan *Transforming growth factor beta* (TGF- β). Ketiga molekul tersebut



ilasi aktivitas monosit melalui perubahan fenotip monosit menuju ti inflamasi. IL-6 diketahui dapat meningkatkan aktivitas anti

inflamasi monosit melalui penekanan ekspresi CD14 sedangkan IL-10 meningkatkan konversi sel monosit menjadi fenotip CD206+ yang memiliki sifat anti inflamasi. TGF- β disisi lain memodulasi neuroinflamasi melalui penekanan aktivasi sel mikroglial.⁵⁵

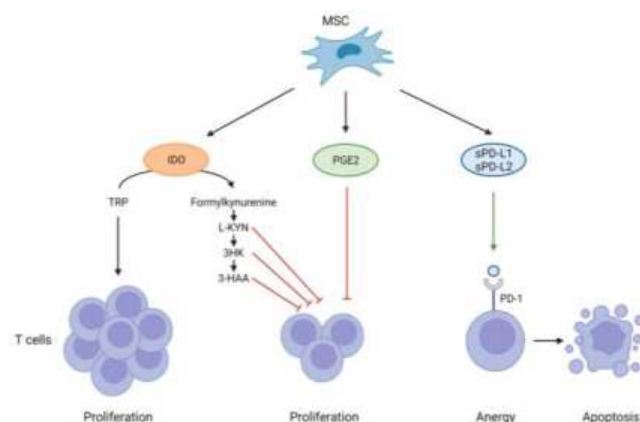
Selain pada sel imunitas bawaan, *secretome* MSC juga memiliki efek modulasi pada sistem imunitas adaptif. Cedera otak pada penderita COT akan menyebabkan kerusakan sel-sel saraf dan kerusakan BBB. Akibatnya, antigen spesifik pada sel SSP dapat tersebar keseluruh tubuh melalui sirkulasi sistemik dan mengaktifkan sel T dan sel B melalui aktivasi sel T-helper oleh sel *antigen presenting cell* (APC). Efek modulasi imunitas adaptif oleh *secretome* MSC terjadi terutama pada sel limfosit T melalui perubahan pada aktivasi dan proliferasi sel limfosit tersebut. Beberapa molekul yang dikeluarkan oleh sel MSC yang dapat memodulasi imunitas adaptif di antara lain enzim *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO), prostaglandin, ligan *programmed death-1* (PD-1) (gambar 2.6). Enzim IDO adalah enzim yang disekresikan oleh sel MSC yang mampu menghambat proliferasi sel T. Enzim ini berperan dalam katalisis degradasi triptofan melalui jaras kynurenine.⁵⁵

Asam amino triptofan (Trp) berperan penting dalam proses proliferasi sel T, degradasi triptofan di jaringan oleh enzim IDO dilaporkan dapat menghambat laju proliferasi sel T.(Lee 2020). Turunan katabolisme Trp

kynurenine (KYN), *3-hydroxykynurenine* (3HK), dan *3-anthranilic acid* (3-HAA) juga dilaporkan dapat secara langsung



menghambat proliferasi sel limfosit T.⁵⁵ Prostaglandin juga merupakan salah satu senyawa komponen *secretome* MSC yang dapat menghambat proliferasi sel limfosit T.⁵⁵ Ghannam melaporkan bahwa pada kultur *in vitro* sel limfosit yang diberikan prostaglandin pada *secretome* MSC, pemberian enzim *cyclooxygenase inhibitors* (COX) yang dapat mengurangi kadar prostaglandin kultur secara bermakna menurunkan efek inhibisi *secretome* pada proliferasi sel limfosit T.⁹¹ Reseptor PD-1 adalah reseptor yang terdapat di permukaan membran sel limfosit T. Aktivasi reseptor ini oleh ligannya (PD-L1 dan PD-L2) memberikan sinyal inhibitori pada sel limfosit T yang dapat menekan sekresi sitokin IL-2 dan menghentikan umpan balik positif *auto-paracrine* sel limfosit T. Berhentinya umpan balik positif ini akan berujung pada *anergy* dan apoptosis sel. Sel MSC diketahui menyekresikan kedua ligan tersebut dan penelitian menunjukkan bahwa kedua ligan tersebut bersifat sinergi yang dibuktikan bahwa pemberian antibodi monoklonal pada salah satu PD-1 ligan tidak menghilangkan efek sel MSC pada *anergy* sel limfosit T.⁵⁵



ambar 2 7. Efek *secretome* MSC pada sel imunitas adaptif.

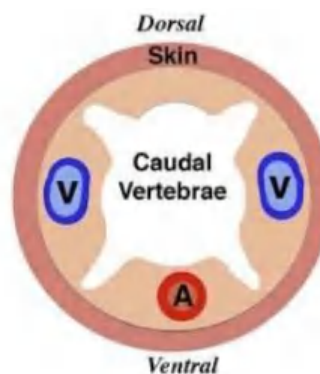


2.2.4.3 Dosis dan Cara Pemberian *Secretome*

Secara umum terdapat tiga metode pemberian *secretome* pada tikus yang banyak dilakukan pada penelitian mengenai COT yaitu secara intravena, intranasal, *intracerebroventricular*, dan intramuskular.

1. Intravena

Injeksi intravena merupakan metode pemberian *secretome* pada model tikus yang banyak digunakan karena mudah untuk dilakukan. Pemberian *secretome* melalui injeksi intravena ini dapat membuat *secretome* tersebar secara sistemik di dalam tubuh tikus sehingga *secretome* dapat tersebar menuju banyak organ termasuk otak. Lokasi vena pada ekor tikus adalah pada kedua sisi lateral ekor tikus sedangkan pada posisi ventral ekor dapat ditemukan arteri ekor tikus (gambar 2.7).⁹²



Gambar 2 8. Anatomi vena dan arteri ekor tikus.⁹²



Salah satu penelitian yang menggunakan metode ini adalah penelitian oleh Zhang. Dalam penelitian ini pemberian *secretome*

secara intravena melalui vena ekor tikus berhasil memberikan pengaruh positif terhadap laju perbaikan fungsional dan plastisitas neurovaskular pada tikus model COT. Penelitian ini memberikan injeksi intravena *secretome* dalam bentuk larutan yang terdiri dari 100 µg *secretome* yang dilarutkan dalam 1 mL *phosphate-buffered saline* (PBS). Efek *secretome* pada tikus diamati dalam 24 jam setelah injeksi.⁸³ Penelitian serupa oleh Ortega juga berhasil menunjukkan efek positif injeksi *secretome* MSC pada tikus model pendarahan intraserebral. Pada penelitian ini, *secretome* diinjeksikan pada vena ekor tikus dengan dosis 0,05 µg/gram berat badan tikus. Sama seperti penelitian lainnya, Ortega melihat efek injeksi *secretome* 24 jam setelah pemberian.⁹³

2. Intranasal

Pemberian *secretome* secara intranasal merupakan metode pemberian yang lebih tidak invasif dibandingkan injeksi intravena. Melalui intranasal, *secretome* dapat diberikan terfokus pada SSP karena *secretome* yang diberikan melalui intranasal akan bergerak menuju SSP melalui saraf olfaktorius dan melewati BBB. Teknik ini walaupun lebih sulit dilakukan dibandingkan injeksi intravena, baik digunakan untuk penelitian yang memfokuskan efek *secretome* pada SP. Salah satu penelitian yang menggunakan *secretome* intranasal adalah penelitian eksperimental oleh Long pada tikus model status



epileptikus. Pada penelitian ini pemberian *secretome* secara intranasal diketahui mencegah neurogenesis abnormal dan gangguan fungsi kognitif pada tikus yang mengalami status epileptikus. Pada penelitian ini *secretome* diberikan sebanyak 75 µg secara serial melalui hidung dalam bentuk 5 µg tiap 5 menit melalui mikropipet bervolume 10 µg.⁹⁴

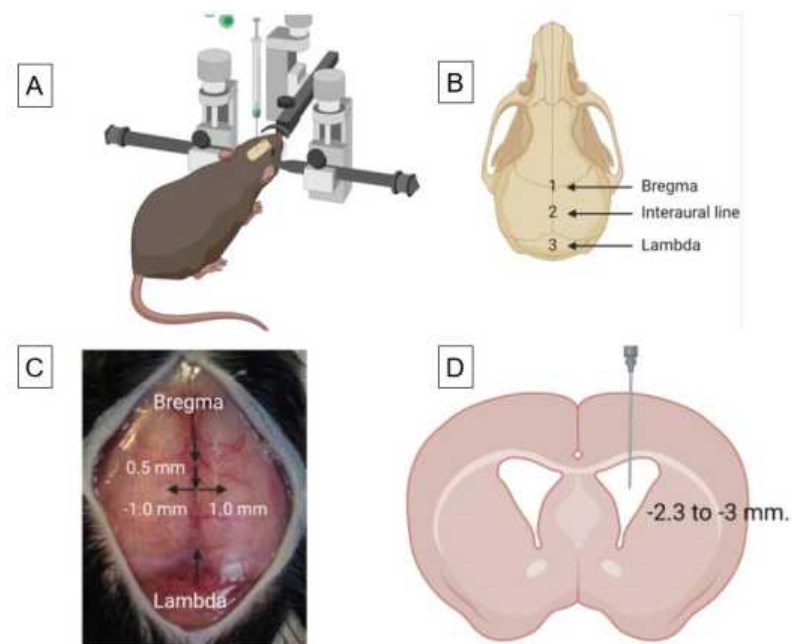
3. Injeksi *intracerebroventricular*

Injeksi *intracerebroventricular* (ICV) merupakan injeksi yang cukup sulit untuk dilakukan namun melalui metode ini *secretome* dapat langsung diinjeksikan pada SSP tanpa melalui BBB. Injeksi intracerebroventricular dilakukan pada tikus yang difiksasi pada alat stereotaxic dalam pengaruh anestesi intranasal (gambar 2.8A). Posisi injeksi ICV dapat ditentukan dengan melihat beberapa struktur anatomi di otak tikus yaitu Bregma, Lambda, dan garis interaural (gambar 2.8B). Posisi injeksi ICV adalah pada kaudal Bregma mengikuti garis interaural lalu sedikit bergeser ke lateral sebanyak 1,0 mm (gambar 2.8C-D).⁹⁵

Salah satu penelitian yang menggunakan injeksi ICV dalam pemberian *secretome* MSC adalah penelitian oleh Nakano. Dalam penelitian ini, injeksi ICV *secretome* dengan dosis 0,5 µg/hari selama 7 hari berhasil memperbaiki fungsi kognitif tikus model diabetes yang



diberikan perlakuan berupa induksi gangguan kognitif (*diabetes-induced cognitive impairment*).⁹⁶



Gambar 2 9. Metode injeksi *intracerebroventricular*.⁹⁵

4. Intramuskular

Injeksi intramuskular pada tikus umumnya dilakukan pada otot paha bagian depan atau otot punggung (area gluteus). Area ini mudah diakses dan memiliki otot yang cukup besar untuk menampung obat. Otot quadriceps femoris adalah pilihan umum. Pegang paha bagian atas dan pastikan tidak ada pembuluh darah besar atau saraf yang dilalui jarum. Dosis intramuskular sama dengan dosis intravena.



Jji Toksisitas Secretome

Uji toksisitas merupakan tahapan esensial dalam pengembangan terapi berbasis *secretome* termasuk yang berasal dari *Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (UC-MSC). Produk *secretome* mengandung berbagai molekul aktif seperti faktor neurotropik (misalnya NGF), angiogenik factors (VEGF, PDGF, FGF), imunomodulator (IL-10, TNF- α , IFN- γ), dan vesikel ekstraseluler (EVs) yang berperan dalam proses regeneratif. Namun, kehadiran senyawa bioaktif ini juga dapat menimbulkan efek sistemik yang tidak diinginkan jika tidak melalui proses pemurnian dan pengujian toksisitas yang memadai. Oleh karena itu, penilaian terhadap keamanan dan kualitas *secretome* perlu dilakukan secara menyeluruh. Pengujian toksisitas secara umum mencakup:

1. Uji Sterilitas

Memastikan bahwa *secretome* bebas dari kontaminasi mikroba hidup seperti bakteri aerob, anaerob, dan jamur. Pengujian ini biasanya menggunakan metode inokulasi langsung ke dalam media pertumbuhan mikrobiologis seperti *Fluid Thioglycollate Medium* untuk mendeteksi bakteri anaerob dan *Soybean-Casein Digest Medium* untuk bakteri aerob dan jamur. Sampel diinkubasi selama 14 hari pada suhu yang sesuai, kemudian diamati adanya kekeruhan atau pertumbuhan koloni mikroba. Hasil negatif menunjukkan bahwa produk steril dan aman dari kontaminan biologis yang dapat menimbulkan infeksi atau gangguan sistemik saat diaplikasikan.



2. Uji Mikoplasma

Mendeteksi kontaminasi oleh bakteri mikoplasma, yaitu mikroorganisme prokariotik yang tidak memiliki dinding sel. Mikoplasma tidak dapat dideteksi dengan metode uji sterilitas konvensional karena ukurannya yang sangat kecil dan kemampuannya berkoloni tanpa menyebabkan kekeruhan pada media. Oleh karena itu, metode khusus seperti PCR DNA *fluorochrome staining* (misalnya Hoechst 33258), atau uji kultur spesifik diperlukan untuk mendeteksi keberadaannya. Kontaminasi mikoplasma dapat mengganggu ekspresi gen, metabolisme sel, dan validitas hasil uji, sehingga deteksinya penting dalam produk berbasis sel dan *secretome*.

3. Uji Endotoksin

Memastikan bahwa *secretome* bebas dari komponen dinding bakteri gram negatif, khususnya lipopolisakarida (LPS) yang bersifat pirogenik. Pengujian ini umumnya dilakukan menggunakan metode *Limulus Amebocyte Lysate (LAL)*, yang memanfaatkan reaksi pembekuan dari darah kepiting tapal kuda (*Limulus polyphemus*) saat terpapar endotoksin. Keberadaan endotoksin, meskipun dalam kadar sangat rendah, dapat menyebabkan reaksi



inflamasi sistemik, demam, bahkan syok endotoksik bila diberikan ke tubuh. Oleh karena itu, produk *secretome* yang lolos uji endotoksin menunjukkan bahwa aman untuk digunakan, terutama dalam aplikasi sistemik atau intravena.

4. Uji pH dan Ukuran EV

Menilai kestabilan fisikokimia dan integritas biologis *secretome*. pH larutan dijaga pada kisaran fisiologis (sekitar 7,0) agar tidak menimbulkan iritasi jaringan atau degradasi senyawa aktif. Sementara itu, ukuran vesikel ekstraseluler (EVs), termasuk eksosom dan mikrovesikel, dievaluasi menggunakan metode seperti *Dynamic Light Scattering* (DLS) atau *Transmission Electron Microscopy* (TEM). Ukuran EVs yang khas (30–200 nm) mencerminkan keberhasilan isolasi dan mempengaruhi efektivitas biologis *secretome*, karena ukuran ini berkaitan dengan muatan protein, RNA, dan kemampuan masuk ke sel target.

5. Skrining Serologi Donor

Memastikan bahwa jaringan asal *secretome* bebas dari penyakit infeksi menular. Pengujian meliputi skrining terhadap berbagai patogen virus seperti HIV, HBV (HbsAg), HCV, CMV, Rubella, HSV- serta parasit seperti *Toxoplasma gondii*. Uji ini dilakukan



menggunakan metode ELISA dan seluruh hasil harus negatif sebelum *secretome* dapat digunakan dalam produksi. Skrining serologi yang ketat merupakan bagian dari standar GMP (*Good Manufacturing Practice*) dan regulasi keamanan biologis untuk produk terapi manusia, guna mencegah risiko zoonosis dan penularan patogen melalui terapi regeneratif.

Sebagai salah satu contoh, *secretome* UC-MSK produksi PT. Prodia StemCell Indonesia telah melalui serangkaian uji toksisitas dan keamanan yang komprehensif. Berdasarkan dokumen *Certificate of Analysis* yang diterbitkan oleh produsen, produk ini menunjukkan hasil negatif pada uji sterilitas, mikoplasma, dan endotoksin, dengan pH stabil (7.0) dan ukuran vesikel ekstraseluler sekitar 160 nm, sesuai karakteristik eksosom fisiologis. Validasi morfologi EVs dilakukan menggunakan *Transmission Electron Microscopy* (TEM), yang menunjukkan struktur vesikel membranosa berbentuk bulat. Selain itu, *secretome* diformulasikan dalam media bebas xeno (*xeno-free*), menggunakan human platelet lysate sebagai sumber faktor pertumbuhan, sehingga menurunkan risiko imunogenisitas lintas spesies. Pengujian serologi donor juga menunjukkan hasil negatif terhadap seluruh panel virus dan patogen yang diuji, termasuk HBsAg, anti-HIV, anti-HCV, CMV IgM, dan lainnya.



Informasi ini memberikan landasan penting bahwa *secretome* UC-MSK dapat diproduksi secara aman dan konsisten, serta memenuhi standar

dasar untuk digunakan dalam penelitian preklinis. Meski demikian, uji toksisitas in vivo dan pemantauan efek jangka panjang tetap diperlukan sebelum terapi ini diterapkan dalam studi klinis.

2.3 Brain-Derived Neurotropic Factor (BDNF)

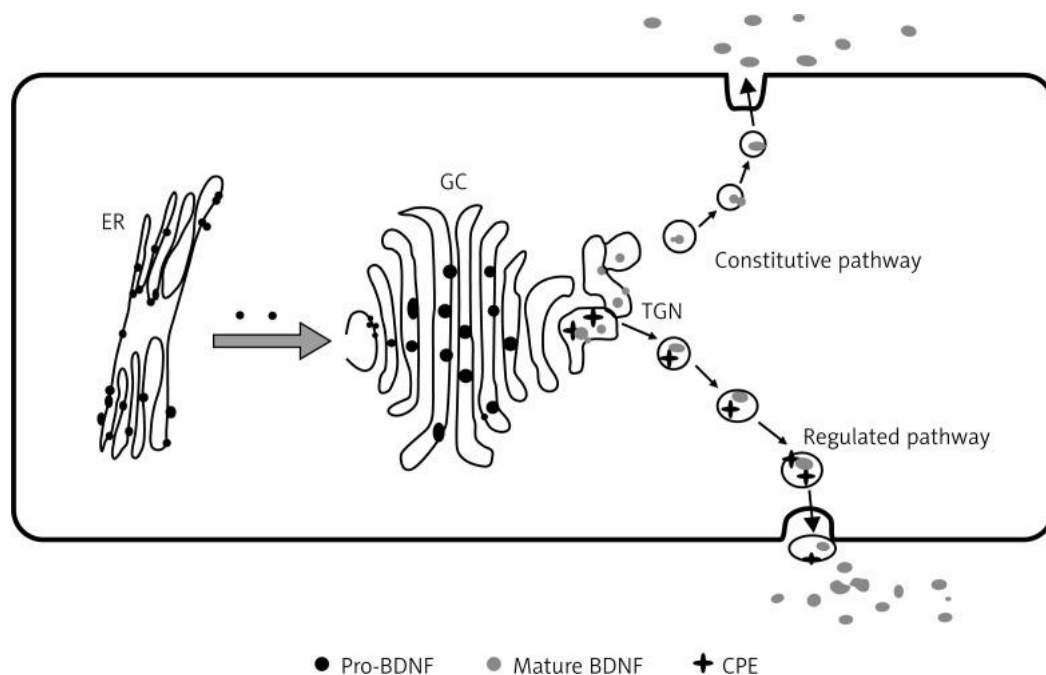
2.3.1 Definisi dan Struktur

BDNF adalah salah satu faktor neurotropik yang diketahui memiliki banyak efek positif dalam mendukung diferensiasi, maturasi, dan kesintasan sel-sel saraf di SSP. BDNF masuk ke dalam famili neurotropin yang masuk ke dalam golongan molekul *growth factor* bersama dengan beberapa molekul lain seperti *nerve growth factor* (NGF); *neurotrophins-3* (NT-3), NT4/5 dan NT-6. Protein BDNF disintesis di dalam retikulum endoplasma sebagai bentuk *proto* BDNF (Pro-BDNF) yang selanjutnya dilakukan modifikasi menjadi BDNF pada badan golgi. Protein BDNF kemudian akan dimasukkan ke dalam vesikel transfer yang akan disekresikan apabila terdapat sinyal/stimulan yang sesuai (gambar 2.5).⁹⁷

Struktur BDNF memiliki homologi (kemiripan) dengan neurotropin lainnya seperti NGF dan NT. Setiap protein neurotropin terdiri dari protein *homodimer* yang terikat secara non-kovalen dengan bagian peptida dan regio *proto* yang terdiri dari situs *N-linked glycosylation*. Struktur gen BDNF, pada tikus gen ini terletak di kromosom 11 dan oleh beberapa *promotor* gen yang dinamakan *promotor* I-IV, situs



pengikatan *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP), *upstream stimulatory factor-1/2* (USF-1/2) yang meregulasi *promotor* I dan III, serta faktor transkripsi *calcium responsive* yang akan berikatan dengan promotor III. Gen BDNF pada manusia memiliki struktur yang mirip dengan gen pada tikus. Pada saat ekspresi gen BDNF manusia, delapan mRNA akan ditranskripsi kan dengan transkrip yang mengandung ekson I-III lebih banyak ditranskripsikan di otak. Laju ekspresi gen BDNF diketahui meningkat tajam saat manusia dilahirkan dan akan secara berangsur-angsur berkurang seiring berjalannya usia manusia.⁹⁷



Gambar 2 10. Proses pembentukan BDNF dari pro-BDNF.⁹⁷



2.3.2 Fungsi BDNF

Berbagai studi sudah mempelajari peran-peran yang dimiliki oleh BDNF dalam SSP. Beberapa fungsi dari BDNF di antara adalah neurogenesis, regulasi plastisitas sinaps, dan imunomodulasi. Neurogenesis merupakan salah satu efek BDNF yang sudah banyak dilaporkan oleh penelitian sebelumnya termasuk studi *in vivo*. Pemberian BDNF secara eksogen diketahui dapat meningkatkan panjang sel dendritik dan memodulasi pola pertumbuhan/perkembangan antar sel dendritik. Scharfman melaporkan bahwa tikus yang diberikan infus BDNF pada bagian hipokampusnya akan mengalami peningkatan neurogenesis pada lapisan sel granula.⁹⁸ Studi menunjukkan bahwa efek neurogenesis yang diberikan oleh BDNF pada NSC ini terbatas pada zona subventrikular (SVZ) dari ventrikel lateral dan zona subgranular (SGZ) di girus dentata hipokampus. Hal ini mungkin disebabkan oleh distribusi reseptor spesifik untuk BDNF yaitu TrkB yang banyak di lokasi tersebut. Hal ini dibuktikan oleh studi Mori pada monyet yang menunjukkan bahwa efek neurogenesis oleh BDNF mengikuti pola dari persebaran reseptor TrkB yang pada monyet ini banyak tersebar di hipokampus dan korteks.⁹⁹

BDNF juga diketahui memiliki efek pada plastisitas sinaps baik pada saraf presinaps maupun pasca sinaps. BDNF diketahui berperan penting



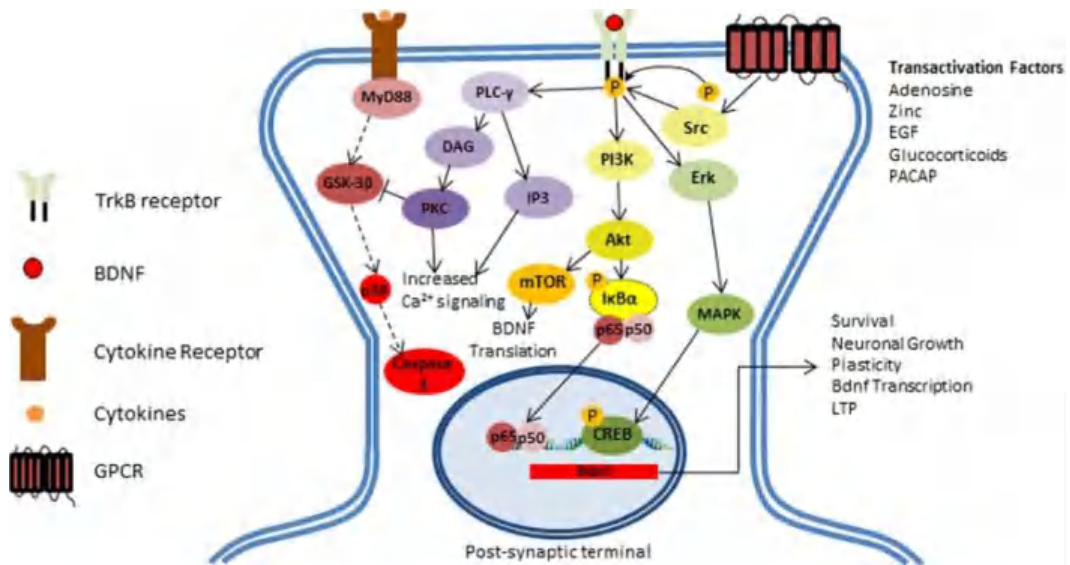
endaurlangan vesikel pada saraf presinaps dan efek ini dilakukan reseptor NMDA sesuai dengan laporan penelitian oleh Ito yang menanamkan saraf neokorteks kultur dari tikus dengan *knockout* BDNF.¹⁰⁰

Efek utama dari BDNF pada plastisitas sinaps adalah menjaga berlangsungnya *long-term potentiation* yang berperan dalam pembentukan ingatan jangka panjang (*long-term memory*). Efek ini didapatkan dari kemampuan BDNF meningkatkan kadar kalsium intrasel melalui interaksinya dengan NMDA serta mengurangi blokade reseptor NMDA oleh ion magnesium.⁹⁷

Pada saat SSP terjadi jejas atau stres, beberapa kaskade jejas proinflamasi akan teraktivasi di berbagai sel yang berujung pada gangguan fungsi saraf dan apoptosis sel. Salah satu protein yang berperan besar dalam jaras inflamasi adalah *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B). BDNF diketahui dapat meningkatkan ekspresi NF- κ B apabila berikatan dengan reseptor TrkB namun jarasnya masih belum diketahui dengan pasti.¹⁰¹ Walaupun BDNF meningkatkan Nf- κ B yang merupakan salah satu protein yang memiliki peran besar dalam inflamasi, jaras aktivasi Nf- κ B oleh BDNF berujung pada efek proliferasi dan kesintasan sel saraf.¹⁰² Nf- κ B yang distimulasi oleh BDNF akan menstimulasi persinyalan yang berujung pada aktivasi enzim kinase IKK α dan IKK β . Kedua kinase ini salah satu unit memfosforilasi salah satu unit inhibitori dari Nf- κ B yaitu I κ B α yang berujung ubikuitinasi dan degradasi dari unit ini. Nf- κ B yang sudah tidak memiliki I κ B α akan menstimulasi pembentukan dimer p50/p65 yang merupakan faktor transkripsi yang akan mengaktifkan berbagai gen penginduksi proliferasi

ntasan sel saraf (gambar 2.6).^{101,102}





Gambar 2 11. Kaskade interaksi antara BDNF dengan NfKb.¹⁰¹

Dalam memberikan efek neurogenesis, kesintasan sel saraf, dan plastisitas sinaps, BDNF dapat memberikan efek tersebut melalui berbagai jaras. Almeida dalam studi ekspreimentalnya menunjukkan adanya keterlibatan jaras *phosphatidylinositol-3-kinase* (PI3-K) dan *Ras/mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dalam stimulasi efek protektif BDNF terhadap kematian sel saraf hipokampus terkultur setelah paparan glutamat kosentrasi tinggi. Dalam studi ini, inkubasi oleh BDNF selama 24 jam dapat mengurangi aktivitas caspase-3 dan mengurangi proporsi sel yang mengalami morfologi apoptosis serta meningkatkan aktivitas jaras PI3-K/MAPK. Dalam studi ini, inhibisi PI3-K diketahui menghilangkan efek protektif dari BDNF dengan derajat efek yang sama dengan melakukan *t* pada gen BDNF itu sendiri.²³



2.3.3 Pengaruh *Secretome* UC-MSC pada BDNF

Protein BDNF diketahui menjadi salah satu perantara dari efek neurogenesis yang diberikan oleh *secretome* UC-MSC. Studi tikus oleh Xu melakukan studi pada tikus untuk membuktikan hipotesis bahwa efek *secretome* oleh MSC yang diberikan melalui infus intravena dapat diperkuat oleh keberadaan BDNF. Dengan menggunakan sel PC12 sebagai model sel saraf, Xu berhasil menunjukkan adanya migrasi PC12 yang secara bermakna lebih tinggi pada kelompok tikus *secretome* + BDNF dibandingkan kelompok *secretome* saja pada 12 dan 24 jam pasca paparan. Stimulasi stres oksidatif dengan peroksida juga menunjukkan bahwa viabilitas sel lebih tinggi pada kelompok kombinasi *secretome* + BDNF yang disebabkan oleh efek *scavaging* ROS yang lebih tinggi pada kelompok sel ini. Efek neurogenesis ini tercerminkan secara klinis dengan tikus yang mendapatkan terapi *secretome* + BDNF memiliki pengetahuan spasial yang lebih tinggi dibandingkan kelompok tikus *secretome*. Deteksi gen menunjukkan bahwa pada vesikel *secretome* sel yang mendapatkan BDNF, kadar miRNA miR21a-5p didapatkan lebih tinggi dibandingkan kelompok sel yang tidak mendapatkan BDNF.¹⁰³ Pemberian injeksi sel MSC dapat secara tidak langsung memberikan efek *secretome* pada SSP termasuk perubahan pada BDNF. Pada studi oleh Park menunjukkan bahwa injeksi MSC dapat menyelamatkan fungsi kognitif pada tikus model peningkatan BDNF dan reseptor dopamin.¹⁰⁴



Walaupun belum diketahui secara pasti, terdapat beberapa komponen *secretome* yang diketahui meningkatkan ekspresi gen BDNF di antara lain miR-133b, miR-146a, dan miR-21. Xin menunjukkan bahwa miR-133b yang terdapat di dalam *secretome* meningkatkan plastisitas dan perbaikan fungsional sel-sel saraf melalui peningkatan ekspresi BDNF menggunakan jalur RhoA/ROCK2.¹⁰⁵ miR-146a diketahui dapat mengurangi inflamasi melalui supresi persinyalan jalur proinflamasi sel astrosit dan secara tidak langsung meningkatkan ekspresi BDNF dengan mekanisme yang belum diketahui secara pasti.¹⁰⁶ miR-21 yang juga merupakan salah satu komponen *secretome* sel MSC diketahui dapat mengurangi inflamasi dan menstimulasi regenerasi sel saraf melalui peningkatan ekspresi BDNF walaupun jalur pasti bagaimana ini terjadi belum dapat ditegakan.⁸³ Suatu studi yang dilakukan oleh Huiyou untuk melihat respon perubahan kadar BDNF pasca pemberian *secretome* MSC. Pada penelitian ini, injeksi *secretome* dilakukan dalam 24 jam pasca pemberian cedera pada tikus percobaan. Pemeriksaan histopatologi untuk mendeteksi BDNF menggunakan metode ELISA dilakukan pada 6, 12, dan 24 jam pasca pemberian *secretome*. Efek injeksi *secretome* terhadap perubahan kognitif *neurobehavior* dilakukan dalam 1, 7, 14, dan 28 hari setelah pemberian *secretome*. Kadar mRNA BDNF juga diukur namun titik waktu pengukuran tidak disebutkan secara spesifik dalam laporan

nya. Studi ini menemukan bahwa kemampuan kognitif tikus yang melalui uji kemampuan spasial dengan labirin lebih tinggi secara



bermakna pada tikus yang diinjeksi *secretome* dibandingkan tikus kontrol yang diinjeksi *phosphate buffer saline* (PBS). Kadar mRNA BDNF juga meningkat sebanyak 2-4 kali lipat pada tikus yang diberikan *secretome*.¹⁰⁷

2.3.4 Studi Mengenai Pengaruh *Secretome* terhadap BDNF

Studi yang mempelajari perubahan ekspresi BDNF serta efeknya terhadap perbaikan fungsi kognitif dan/atau jaringan saraf akibat paparan terhadap *secretome* MSC dirangkum dalam tabel 2.1.

Tabel 2 1. Studi yang mempelajari pengaruh *secretome*, BDNF, dan MSC terhadap kerusakan sel saraf.

Penulis (tahun)	Subjek	Model penyakit	Jenis MSC	Temuan
Almedia (2005). ²³	<i>in vitro</i>	Apoptosis terinduksi <i>excitotoxicity</i> glutamat	-	- Sel saraf hipokampus mengalami penurunan angka apoptosis sel setelah pemberian BDNF dibandingkan kontrol. - BDNF memberikan efeknya melalui jaras ERK dan PI3-kinase.
107	Tikus	COT	BM-MSC	Pemberian <i>secretome</i> dan BDNF mengurangi stres oksidatif dan meningkatkan migrasi sel PC12 pada jam ke-12 dan ke-24 dibandingkan kontrol.



Penulis (tahun)	Subjek	Model penyakit	Jenis MSC	Temuan
				• Pemberian <i>secretome</i> dan BDNF meningkatkan fungsi sensoris dan pembelajaran spasial tikus pada hari ke-7 dibandingkan kontrol.
Jeong (2021). ¹⁰⁸	Tikus	Alzheimer	UC-MSC	• Injeksi UC-MSC secara intravena meningkatkan kadar <i>secretome</i> di jaringan otak tikus dilihat dari peningkatan <i>marker</i> CD63 dan CD81. • Keberadaan <i>secretome</i> UC-MSC di otak meningkatkan ekspresi BDNF dan memicu neurogenesis.
Liu (2022). ¹⁰⁹	Tikus	Alzheimer	BM-MSC	• Injeksi <i>secretome</i> BM-MSC pada ventrikel lateral memperbaiki luaran perilaku alzheimer tikus. • Injeksi <i>secretome</i> BM-MSC pada ventrikel lateral meningkatkan ekspresi BDNF di hipokampus otak. • Peningkatan kadar BDNF berkorelasi negatif dengan aktivasi glial dan ekspresi sitokin proinflamasi.



Penulis (tahun)	Subjek	Model penyakit	Jenis MSC	Temuan
Bang (2022). ¹¹⁰	Tikus	Stroke	tidak dispesifikan	• Injeksi sel MSC secara cepat meningkatkan kadar <i>secretome</i> dalam aliran darah pasien. • Peningkatan kadar <i>secretome</i> dalam darah berkorelasi positif dengan perbaikan fungsi motoris. • Pasien yang diberikan injeksi MSC mengalami peningkatan kadar BDNF.
Sasaki (2009). ¹¹¹	Tikus	SCI	BM-MSC	• Injeksi sel BM-MSC yang dimodifikasi untuk mensekresikan BDNF pada tikus memperbaiki luaran lokomotor tikus dan memiliki lebih banyak pertumbuhan akson dibandingkan kontrol yang diinjeksi sel BM-MSC tanpa modifikasi.
Choi (2023). ¹¹²	Tikus	COT	MSC	• Sel MSC dimodifikasi untuk mensekresikan BDNF (eMSC). Ekspresi BDNF ditemukan lebih tinggi dibandingkan <i>naïve</i> MSC • Tikus diberikan perlakuan TBI dengan metode



Penulis (tahun)	Subjek	Model penyakit	Jenis MSC	Temuan
				<i>controlled cortical impact</i> (CCI). Dibandingkan kontrol, injeksi eMSC pada tikus model COT memiliki angka kematian sel saraf dan aktivasi glial yang lebih rendah serta peningkatan neurogenesis di hipokampus.
Kodali (2023). ¹¹³	Tikus	COT	MSC	- Ditemukan peningkatan kadar BDNF hingga fase kronik COT setelah pemberian <i>secretome</i> MSC dosis tinggi melalui intranasal. - Pemberian <i>secretome</i> MSC melalui intranasal mengurangi kerusakan sinaps saraf pada 48 jam setelah perlakuan COT.
Sultan (2021). ¹¹⁴	Tikus	COT	MSC	- Sel MSC dimodifikasi untuk mensekresikan BDNF dan dikapsulasi dalam <i>silk-fibroin hydrogen</i> diinjeksikan pada tikus melalui pendekatan trans-septal. - Pemberian injeksi ini diketahui meningkatkan panjang akson sel



Penulis (tahun)	Subjek	Model penyakit	Jenis MSC	Temuan
				saraf dan memperbaiki luaran kognitif dalam 7 hari.
Velthoven (2012). ¹¹⁵	Tikus	Stroke	MSC	Pemberian MSC yang dimodifikasi untuk mensekresikan BDNF secara intranasal secara bermakna memperbaiki luaran kognitif tikus dalam 14 hari

BDNF: *brain-derived neurotrophic factors*; MSC: *mesenchymal stem cell*;

BM-MSC: *bone marrow mesenchymal stem cell*; SCI: *spinal cord injury*;

COT: cedera otak traumatik.

2.4 Stromal Cell Derived Factor-1 (SDF-1)

2.4.1 Definisi dan Struktur

SDF-1 adalah salah satu dari famili protein kemokin yang memiliki peran utama berupa mobilisasi sel-sel imun menuju targetnya. SDF-1 atau yang sering disebut sebagai C-X-C *chemokine motif* 12 (CXCL12) ini dikode oleh gen yang berada di kromosom 10 lebih tepatnya pada lokus 10q11.1. Gen SDF-1 terdiri dari 6 ekson gen dan dapat menghasilkan setidaknya 6 protein *isoform* melalui proses *alternative splicing* dengan memilih beberapa ekson



berbeda-beda.¹¹⁶ Protein ini masuk ke dalam golongan *intercrine* dan diekspresikan dalam dua bentuk protein yaitu *SDF-1α/CXCL12a*

dan *SDF-1 β /CXCL12b* melalui proses *alternative splicing*. Protein kemokine memiliki ciri khas berupa empat asam amino sistein yang terkonservasi dan membentuk dua ikatan disulfida. Ciri khas ini juga terdapat di CXCL12 namun pada protein ini kedua pasang asam amino sistein dipisahkan oleh satu asam amino. Delapan asam amino pertama di ujung-N CXCL12 berfungsi sebagai tempat pengikatan reseptor (*receptor binding site*). Motif REFRESH pada asam amino 12 sampai 17 berfungsi sebagai situs *docking* untuk CXCL12 saat berikatan dengan reseptornya.^{117,118}

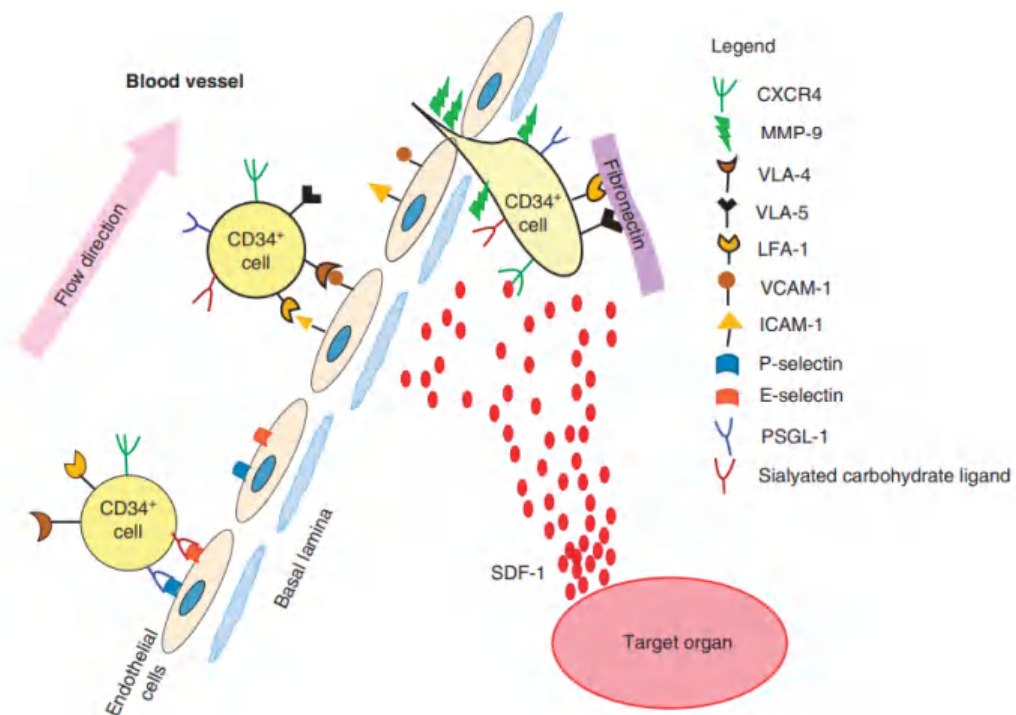
2.4.2 Fungsi SDF-1

SDF-1 sebagai sebuah kemokin CXCL12 berperan sebagai sinyal yang mengarahkan suatu sel menuju tujuannya. SDF-1 pada sel imun perifer akan berikatan dengan reseptornya dan menyebabkan sel imun tersebut terikat kuat di endotel dan memulai proses migrasi *diapedesis* melalui celah endotel pembuluh darah menuju target sel yang mensekresikan SDF-1 (gambar 2.7).¹¹⁹ Pada kasus adanya paparan jejas di aliran darah sistemik seperti oleh agen kemoterapi dan radiasi, kerusakan sel-sel darah akan memicu peningkatan SDF-1 di aliran darah sistemik. Peningkatan SDF-1 ini akan memicu migrasi *Hematopoietic stem cell* (HSC) melalui interaksi SDF-1/CXCR4 pada sel CD34+. Dalam kondisi tanpa SDF-1, sel CD34+ akan

“bermigrasi” di sekitar sel endotel pembuluh darah melalui serangkaian ikatan antara PSGL-1 dan ligan karbohidrat di membran sel CD34+ dengan



p-selectin dan *e-selectin* pada membran endotel. Keberadaan SDF-1 akan menghentikan proses “berguling” ini dan menyebabkan adesi sel melalui stimulasi ikatan *very late antigen-4* (VLA-4) dan *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) di membran endotel dengan *Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) dan *intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) di membran sel CD34+. Sel CD34+ yang mengalami adesi akan mensekresikan MMP-9 dan memulai proses migrasi melalui sel endotel sebelum akhirnya akan menuju sel target melalui kemotaksis mengikuti peningkatan konsentrasi SDF-1 yang disekresikan oleh sel target tersebut.¹¹⁹



ambar 2 12. Interaksi SDF-1 dengan sel CD34+ memicu adesi dan migrasi sel tersebut melalui celah endotel.¹¹⁹



Selain berfungsi sebagai senyawa kemotaksis sel imun perifer, SDF-1 juga memiliki peran dalam SSP sebagai pemandu migrasi sel punca dan berperan positif terhadap neurogenesis di orang dewasa. SDF-1 diketahui dapat menstimulasi proliferasi sel punca saraf melalui peningkatan fosforilasi *AKT Serine/Threonine Kinase 1* (Akt-1) dan *Forkhead box O3A* (FOXO3A) yang berujung pada peningkatan laju siklus sel. Selain itu, interaksi antara SDF-1 dan CXCR4 juga diketahui memiliki andil dalam proses neurogenesis melalui modulasi kemotaksis sel punca saraf baik pada masa perkembangan embrio maupun pada orang dewasa. Pada masa perkembangan awal embrio, SDF-1 dan CXCR4 berperan sebagai pemandu kemotaksis migrasi sel granular dari hilus menuju *dentate gyrus* (DG) serta menstimulasi morfogenesis sel saraf di DG.¹²⁰ Selain itu, pada studi eksperimental dengan tikus, Kokovay melaporkan bahwa SDF-1 meningkatkan motilitas sel neuroblas tipe A dari SVZ menuju bulbus olfaktori.¹²¹ Selain kemotaksis, SDF-1 juga menunjukkan efek stimulasi diferensiasi sel punca saraf menjadi sel saraf dewasa. Studi *in vitro* oleh Shinjyo menunjukkan bahwa kultur sel punca saraf yang diberikan SDF-1 konsentrasi rendah hingga tinggi mengalami peningkatan ekspresi NSE hingga 2,3 kali lipat, peningkatan fraksi sel saraf positif terhadap *microtubule-associated protein 2* (MAP2ab), dan pengurangan fraksi sel



Ketiga temuan ini mendukung hipotesis bahwa SDF-1 secara signifikan menstimulasi sel punca saraf untuk berdiferensiasi menjadi sel saraf dewasa secara *in vitro*.¹²² Peningkatan neurogenesis oleh SDF-1 juga

ditemukan pada SSP setelah mengalami stroke iskemik. Kadar SDF-1 diketahui mengalami peningkatan dalam 24 jam pasca stroke, mengalami puncaknya pada 7 hari pasca stroke, dan bertahan hingga 16 minggu. Migrasi neuroblas melalui interaksi SDF-1/CXCR4 diketahui berperan penting dalam neurogenesis pasca stroke.¹²⁰ Imitola melaporkan adanya migrasi sel neuroblast yang dimediasi oleh interaksi SDF-1/CXCR4 menuju zona peri-infark.¹²³ Studi mengenai efek pemberian SDF-1 pada model tikus COT sudah pernah dilakukan sebelumnya. Injeksi SDF-1 pada tikus model untuk COT menunjukkan bahwa molekul ini dapat menstimulasi migrasi dari *neural stem cell* (NSC) pada area otak yang mengalami jejas. Stimulasi migrasi sel NSC ini diketahui dapat meningkatkan laju penyembuhan jaringan otak yang mengalami jejas.²⁸ Guo melaporkan bahwa injeksi stroma mesenkimal pada model tikus untuk COT dapat mengurangi apoptosis sel saraf melalui jalur HIF-1 α /SDF-1/CXCR4 yang meningkatkan laju migrasi *bone marrow-derived mesenchymal cells* (BM-MSCs).¹²⁴

2.4.3 SDF-1 Memandu Migrasi dan Sekresi *Secretome* di Sistem Saraf Pusat

Interaksi utama antara SDF-1 dengan MSC adalah interaksi kemotaksis antara SDF-1 dan MSC. Interaksi kemotaksis ini atau yang sering disebut



“*MSC homing*” sudah banyak dipelajari di berbagai sistem organ k SSP. Ling melaporkan bahwa aksis CXCR4/SDF-1 berperan

penting dalam *homing human amnion-derived mesenchymal stem cells* (hAD-MSC) pada ovarium tikus yang diberikan cedera dengan kemoterapi.¹²⁵ Dalam telaah literatur yang dilakukan oleh Karp, interaksi antara SDF-1 yang dikeluarkan oleh jaringan saraf hipoglosal yang mengalami cedera dengan CXCR4 yang diekspresikan oleh *bone marrow* MSC (BM-MSC) merupakan salah satu interaksi penting yang memediasi terjadinya *homing* BM-MSC menuju lokasi cedera dan memberikan efek *secretome*-nya di lokasi cedera tersebut.¹²⁶ Terdapat beberapa faktor teknis mengenai perlakuan pada MSC selama masa kultur yang dapat meningkatkan atau mengurangi pemberian *secretome* MSC pada jaringan luka. Perlakuan kultur ini dapat berpengaruh terhadap bagaimana MSC dapat sampai di lokasi cedera (*homing*) dan melepaskan *secretome*-nya untuk memberikan berbagai efek untuk penyembuhan luka. Konfluensi kultur MSC (seberapa luas sel MSC menempel pada permukaan kultur) dalam kondisi laboratorium sebelum diinfuskan pada penderita mempengaruhi potensi *homing* dari MSC tersebut. Konfluensi kultur yang terlalu tinggi diketahui menurunkan potensi *homing* dari MSC akibat peningkatan produksi *metalloproteinase* (MMP) *inhibitor*.¹²⁶ Kultur MSC juga diketahui dapat mengurangi jumlah reseptor kemotaksis yang berpengaruh terhadap kemampuan *homing*-nya. CXCR4 yang merupakan reseptor SDF-1 diketahui berkurang pada sel MSC kultur namun pemberian



yang berisi campuran berbagai sitokin pada kultur MSC diketahui menginduksi ekspresi CXCR4 yang tinggi sehingga mengembalikan

potensi *homing* MSC pada jaringan trauma yang mensekresikan SDF-1.^{127,128} *Pre-conditioning* kultur MSC dengan kondisi hipoksia juga diketahui meningkatkan ekspresi CXCR4 pada kultur melalui peningkatan VEGF sehingga meningkatkan *homing* MSC oleh SDF-1.¹²⁹

SDF-1 juga dapat meningkatkan migrasi sel MSC dengan memodulasi matriks ekstraseluler jaringan saraf. Interaksi antara SDF-1 dan CXCR4 juga diketahui dapat meningkatkan MMP. Peningkatan enzim ini dapat menambah degradasi matriks ekstraseluler (ECM) yang dapat meningkatkan laju motilitas migrasi sel MSC. Selain itu, ekspresi SDF-1 juga dihubungkan dengan peningkatan proliferasi sel endotel dan angiogenesis di lokasi lesi yang mengalami hipoksia, salah satunya akibat hematoma pasca COT, melalui peningkatan ekspresi Vascular endothelial growth factor (VEGF) yang diperantarai oleh *Early growth response-1* (Egr-1) dan *Extracellular regulated kinases* (ERK) 1/2.¹³⁰

Terdapat satu studi yang memberikan informasi mengenai kecepatan respon perubahan ekspresi mRNA. Studi yang dilakukan oleh Youn meneliti bagaimana protein Ang1 dapat meningkatkan migrasi sel BM-MSC melalui perubahan ekspresi SDF-1 pada sistem saraf pusat yang mengalami iskemia. Perubahan SDF-1 dinilai dari perubahan ekspresi pada jaringan yang dinilai dengan metode ELISA pada 3,7, dan 14 hari setelah pemberian Ang1 dan dari perubahan kadar mRNA SDF-1 setelah

an Ang1. Studi ini menunjukkan bahwa pemberian cedera iskemik bermakna meningkatkan ekspresi SDF-1 pada jaringan dan



pemberian Ang1 ini meningkatkan ekspresi SDF-1 lebih tinggi lagi. Selain itu, pemberian Ang1 juga merubah pola ekspresi mRNA SDF-1. Penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan ekspresi mRNA SDF-1 yang mencapai nilai puncaknya pada 3 jam setelah pemberian Ang1 dan berkurang dalam 6 jam. Disisi lain, ekspresi protein SDF-1 meningkat dan mencapai puncaknya pada 6 jam setelah pemberian Ang1 dan mulai menurun dalam 12 jam.¹³¹

2.4.4 Studi Mengenai Pengaruh *Secretome* terhadap SDF-1

Studi yang mempelajari perubahan ekspresi SDF-1 serta efeknya terhadap perbaikan fungsi kognitif dan/atau jaringan saraf akibat paparan terhadap *secretome* MSC dirangkum dalam tabel 2.2.

Tabel 2 2. Studi yang mempelajari pengaruh *secretome*, MSC, dan SDF-1 terhadap kerusakan sel saraf

Penulis (tahun)	Subjek	Model penyakit	Jenis MSC	Temuan
Guo (2020). ¹²⁴	Tikus	COT	BM- MSC	Sel BM-MSC yang telah diinkubasi pada medium berisi SDF-1 dan HIF-1α mengalami peningkatan laju migrasi dan mengurangi apoptosis sel saraf pada tikus model COT.
132	Tikus	Parkinson	hMSC	SDF-1 ditemukan pada <i>secretome</i> MSC dan tidak ditemukan pada <i>conditioned medium</i> sebagai kontrol.



Penulis (tahun)	Subjek	Model penyakit	Jenis MSC	Temuan
				• Injeksi sel MSC dan <i>secretomenya</i> pada tikus meningkatkan neurogenesis pada ventrikel lateral dan striata dalam otak.
Wei (2012). ¹³³	Tikus	Iskemik Serebral	BM- MSC	• <i>Preconditioning</i> sel BM- MSC dengan kondisi hipoksia meningkatkan ekspresi SDF-1, VEGF, dan HIF-1α pada <i>secretomenya</i>.
Ma (2021). ¹³⁴	Tikus	COT	BM- MSC	• Pemberian BM-MSC yang disertai hidrogel yang terdiri dari kombinasi <i>sodium alginate</i>, kolagen, dan SDF-1 meningkatkan migrasi BM-MSC di dalam jaringan otak tikus model COT • Peningkatan migrasi disertai peningkatan neurogenesis.
Zamproni (2017). ¹³⁵	Tikus	COT	-	• Injeksi SDF-1 yang terbungkus <i>nanoparticle</i> ke otak tikus pasca COT meningkatkan migrasi <i>neural stem cell</i> menuju lokasi lesi.
Stewart (2017). ¹³⁶	Tikus	SCI	MSC	• Pemberian sel MSC yang dimodifikasi untuk mensekresikan SDF-1 secara berlebih meningkatkan pertumbuhan akson saraf pada tikus model SCI.
Deng (2017). ¹³⁷	Tikus	COT	BM- MSC	• Peningkatan ekspresi CXCR4 yang diinduksi oleh SDF-1 akibat transplantasi BM-MSC meningkatkan perbaikan jaringan lesi pasca COT



Penulis (tahun)	Subjek	Model penyakit	Jenis MSC	Temuan
Cui (2007). ¹³⁸	Tikus	Stroke	BM- MSC	Pemberian donor NO dengan DETA-NONOate meningkatkan ekspresi SDF-1/CXCR4 yang meningkatkan migrasi BM-MSC pada jaringan lesi
Yu (2015). ¹³⁹	Tikus	stroke iskemik	MSC	Konsentrasi HIF-1α dan SDF-1 meningkat pada hipokampus tikus model iskemia dan mencapai puncak konsentrasi pada 7 hari setelah pemberian MSC
Liu (2011). ¹⁴⁰	<i>in-vitro</i>	-	BM- MSC	Pemberian SDF-1 pada sel MSC meningkatkan kesintasan sel pada jaringan dan meningkatkan sekresi <i>secretome</i> yang mengandung sitokin angiogenik

SDF-1: *stromal cell-derived factor 1*; MSC: *mesenchymal stem cell*; BM-

MSC: *bone marrow* MSC; hMSC: *human* MSC; COT: cedera otak traumatik.

2.5 Neuron-Specific Enolase (NSE)

2.5.1 Definisi dan Struktur

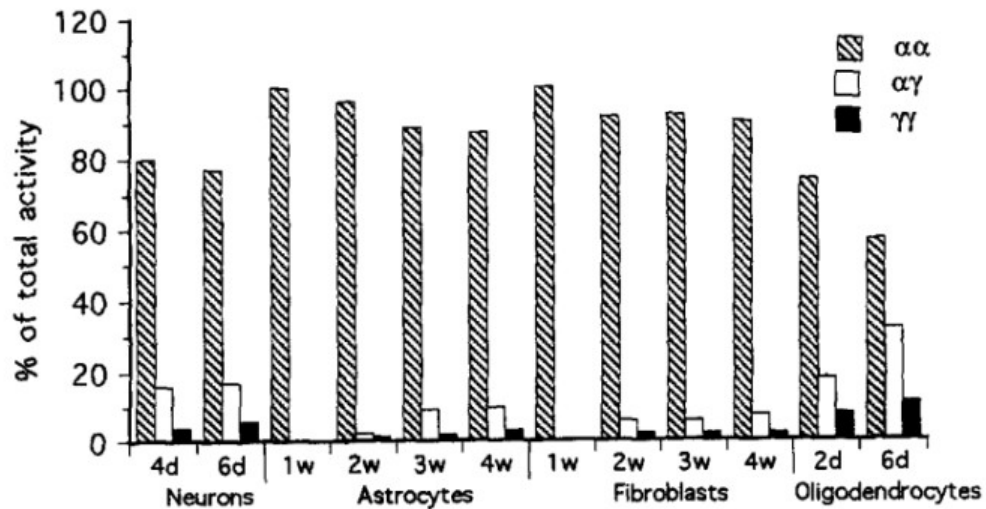
NSE adalah *biomarker* kerusakan otak akut yang terlihat pada CSF dan darah, yang disebabkan oleh pecahnya membran sel neuron, dan merupakan tanda sensitif dari cedera otak yang disebabkan oleh hipoksia, iskemia, atau trauma SSP.²⁹ NSE adalah salah satu *isoform* dari enzim

yaitu *enolase* dan sering disebut sebagai *enolase 2*. *Enolase* merupakan enzim yang berperan dalam salah satu langkah dari



metabolisme glukosa melalui proses glikolisis. Enzim ini berperan dalam merubah *2-phosphoglycerate* menjadi *phosphoenolpyruvate*. *Enolase* memiliki tiga *isoenzyme* yaitu *enolase alpha* yang ditemukan pada semua sel, *enolase beta* yang spesifik terdapat di sel otot, dan *enolase gamma* (NSE) yang spesifik terdapat di sel saraf.¹⁴¹ Gen dari NSE yaitu gen ENO2 memiliki panjang sekitar 9kb yang terdiri dari 12 ekson dan 11 intron.¹⁴² NSE adalah homodimer yang memiliki tiga jenis bentuk yaitu *alpha-alpha* NSE ($\alpha\alpha$ -NSE), *gamma-gamma* NSE ($\gamma\gamma$ -NSE), dan *alpha-gamma* NSE ($\alpha\gamma$ -NSE) yang banyak diekspresikan oleh sel mikorglia, oligodendrosit, dan astrosit. Secara umum pada sel-sel saraf pusat, $\alpha\alpha$ -NSE adalah sub tipe NSE yang paling banyak diekspresikan pada semua sel saraf pusat. Sub tipe NSE yang paling sedikit di ekspresikan oleh sel saraf pusat adalah $\gamma\gamma$ -NSE dan sub tipe ini paling banyak diekspresikan di sel oligodendrosit. (gambar 2.12).¹⁴³





Gambar 2 13. Proporsi tingkat ekspresi berbagai sub tipe NSE di berbagai jenis sel di sistem saraf pusat.¹⁴³

2.5.2 Fungsi NSE

Fungsi utama dari NSE adalah sebagai *biomarker* dan sudah banyak dipelajari berhubungan dengan berbagai jenis kanker baik saraf maupun non-saraf dan cedera SSP. NSE pertama kali dideskripsikan pada tahun 1965 oleh Moore dan pertama kali digunakan sebagai *biomarker* untuk memprediksi terjadinya kanker neuroendokrin oleh Prinz.^{144,145} Pada kanker neuroendokrin, NSE digunakan sebagai *biomarker* diferensiasi dari tumor neuroendokrin dan marker sekresi tumor tersebut. Selain itu, NSE pada kasus tumor neuroendokrin dapat digunakan sebagai *biomarker follow-up*



menunjukkan tingkat respon penderita terhadap regimen tata laksana baik bedah maupun kemoterapi/radioterapi serta memprediksi relaps.¹⁴⁶ Selain pada tumor neuroendokrin, NSE juga diketahui

memiliki nilai diagnostik yang baik dalam mendiagnosis terjadinya *small cell lung cancer* (SCLC) dengan akurasi diagnosis sebesar 75% serta dapat digunakan dalam menentukan prognosis penderita tersebut walaupun sensitifitasnya rendah.¹⁴⁷ Namun perlu diperhatikan bahwa angka positif palsu dari NSE dalam memprediksi diagnosis SCLC relatif tinggi.¹⁴⁸ Pada tumor SSP, banyak studi yang menghubungkan *biomarker* NSE dengan tumor neuroblastoma. Tumor neuroblastoma adalah tumor yang muncul dari *neural crest* primordial dan merupakan tumor solid ekstrakranial yang paling banyak terjadi pada anak.¹⁴⁹ Zeltzer dalam studinya melaporkan bahwa kadar serum NSE lebih dari 100 ng/mL diasosiasikan dengan luaran tata laksana yang lebih buruk pada anak dengan neuroblastoma stadium klinis IV dengan metastasis sehingga studi ini menunjukkan potensi prediksi prognosis dari NSE pada penderita dengan neuroblastoma.¹⁵⁰ Dalam meta analisisnya, Riley menunjukkan bahwa penderita dengan kadar serum NSE yang tinggi memiliki luaran tata laksana neuroblastoma yang lebih tinggi ditunjukkan dengan peningkatan *hazard* pada *disease-free survival* dan *overall survival*.¹⁵¹

NSE juga dapat digunakan sebagai *biomarker* untuk terjadinya jejas pada SSP. Penelitian mengenai potensi NSE dalam memprediksi terjadinya jejas pada otak terutama iskemia jaringan otak sudah banyak dilakukan.

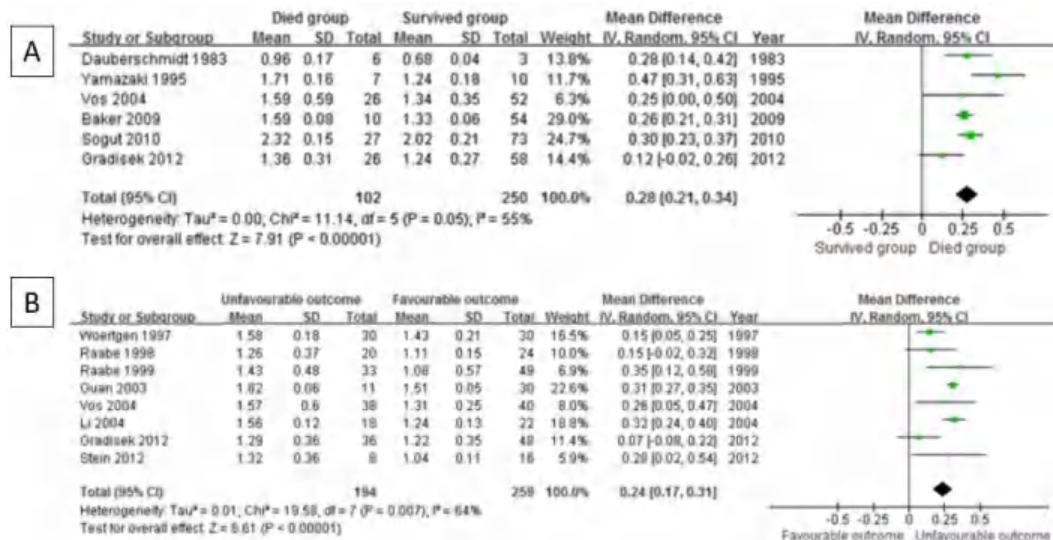
Penggunaan NSE pada kasus stroke iskemia ini banyak diteliti karena



lebih murah dan praktis untuk dilakukan terutama untuk timasi derajat luas jaringan yang mengalami jejas dibandingkan

pemeriksaan radiologis tingkat lanjut. Studi-studi yang ada saat ini menunjukkan hasil yang kontroversial dengan beberapa studi menunjukkan korelasi positif yang bermakna antara jumlah kadar serum NSE dengan luas infark jaringan otak dan derajat keparahan stroke pada saat admisi rumah sakit dan beberapa studi lain tidak menunjukkan adanya korelasi bermakna. NSE juga banyak diteliti sebagai *biomarker* yang dapat digunakan untuk memprediksi luaran fungsional SSP pasca tindakan pada penderita stroke namun temuan ini juga masih kontroversial.¹⁴⁶ Beberapa penelitian juga dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan prediksi *biomarker* NSE dalam memprediksi prognosis penderita COT. Guzel pada studinya yang melibatkan 169 penderita COT menunjukkan bahwa terdapat korelasi negatif bermakna antara kadar serum NSE pada 2, 24, dan 48 jam pasca trauma dengan kesadaran penderita yang dinilai dengan *Glasgow Coma Scale* (GCS). Selain itu, studi ini juga menunjukkan bahwa penderita yang meninggal 30 hari pasca trauma memiliki nilai kadar NSE yang lebih tinggi secara bermakna dibandingkan penderita yang hidup. Guzel menyimpulkan bahwa walaupun pada kasus COT, kadar serum NSE memiliki banyak variabel perancu seperti derajat pendarahan, cedera hepar dan ginjal, serta hipoperfusi perifer, NSE mungkin masih dapat digunakan sebagai data tambahan yang dapat digunakan untuk stratifikasi derajat keparahan penderita COT.¹⁵²





Gambar 2 14. Forest plot hubungan kadar NSE dengan mortalitas dan luaran klinis pada penderita dengan COT.¹⁵³

Temuan serupa juga dilaporkan oleh Meric dalam studi prospektif yang melibatkan 80 penderita. Dalam studi ini, Meric menilai hubungan antara kadar serum NSE dengan kesadaran penderita yang dinilai dengan GCS pada beberapa kelompok penderita yaitu penderita dengan cedera badan umum tanpa cedera kepala, penderita cedera kepala ringan, cedera kepala sedang, dan cedera kepala berat. Analisis kurva *receiver operating characteristics* (ROC) menunjukkan nilai potong kadar serum NSE sebesar 20,52 ng/mL. Studi ini melaporkan bahwa terdapat peningkatan kadar NSE yang bermakna antara penderita tanpa cedera otak dan penderita dengan cedera otak dan kadar NSE berkorelasi positif dengan derajat cedera otak.



negatif bermakna juga ditemukan antara kadar NSE dengan nilai penderita. Dengan menggunakan nilai potong 20,52 ng/mL, analisis

kurva ROC menunjukkan bahwa kadar serum NSE dapat memprediksi luaran neurologis buruk (GCS <3) dengan sensitifitas 87% dan spesifisitas 82,1%.¹⁵⁴ Sebuah studi meta analisis oleh Cheng menunjukkan bahwa pada penderita dengan COT, kadar NSE secara bermakna lebih tinggi pada penderita yang mengalami kematian (*mean difference* (MD) 0,28; interval kepercayaan 95% (IK95) 0,21 – 0,34; $p < 0,0001$) dan lebih tinggi pada penderita yang mengalami luaran klinis tidak baik (*unfavorable outcome*) (MD 0,24; IK95 0,17 – 0,31; $p < 0,0001$) (gambar 2.13). Namun perlu diperhatikan bahwa hasil meta analisis ini masih memiliki heterogenitas studi yang tinggi ($I^2 > 50\%$) dan masih memiliki bias berdasarkan uji *funnel plot* baik untuk mortalitas maupun luaran klinis penderita COT.¹⁵³

2.5.3 NSE Sebagai *Biomarker* Diferensiasi Sel MSC

Sama seperti fungsi NSE pada umumnya, pada konteks tata laksana cedera otak dengan menggunakan *secretome* dari UC-MSC, NSE berperan sebagai *biomarker* terjadinya diferensiasi sel MSC menjadi sel neuron. Dalam menjalankan fungsinya untuk mempercepat proses penyembuhan penderita dengan cedera otak atau penyakit saraf degeneratif, MSC menjalankan fungsi tersebut melalui berbagai cara yaitu mengurangi apoptosis dan neuroinflamasi, meningkatkan angiogenesis jaringan saraf, memicu sinaptogenesis, myelinasi serabut saraf, dan neurogenesis secara

han (gambar 2.14). Berbagai mekanisme tersebut dapat diraih tunya adalah melalui proses sekresi *secretome* oleh MSC selama but berada di SSP. Diferensiasi sel MSC menjadi sel neuron sangat



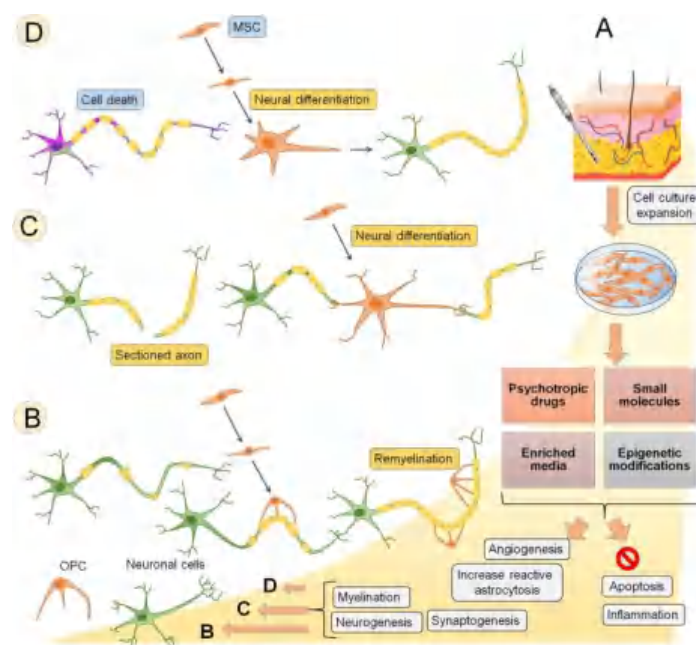
penting dalam menunjang fungsi MSC dan sekresi *secretome* selama sel tersebut berada di jaringan SSP karena diferensiasi sel MSC menjadi sel neuron akan meningkatkan kesintasan sel tersebut di jaringan SSP dan meningkatkan efek neurogenesisnya. Diferensiasi MSC menjadi sel neuron dapat diprogram selama masa kultur sel MSC sebelum diberikan kepada penderita. Pemrograman sel MSC ini dapat dilakukan dengan memaparkan kultur sel MSC dengan obat psikotropik, molekul kecil spesifik, media khusus, atau dengan modifikasi epigenetik.¹⁵⁵

Penggunaan NSE sebagai *biomarker* terjadinya diferensiasi sel MSC sudah dilakukan oleh berbagai studi. Liu melakukan penelitian *in vitro* mengenai stimulasi diferensiasi sel *bone marrow mesenchymal stem cell* (BM-MSC) menjadi sel mirip sel saraf melalui transfeksi gen BDNF dengan menggunakan plasmid. Sel BM-MSC yang sudah distimulasi untuk diferensiasi diketahui memiliki laju pertumbuhan kultur yang lebih tinggi dibandingkan sel yang tidak distimulasi. *Biomarker* berupa mRNA NSE juga diketahui dieskpresikan lebih tinggi secara bermakna pada sel BM-MSC yang sudah terdiferensiasi menjadi sel saraf dibandingkan sel BM-MSC yang tidak berdiferensiasi.¹⁵⁶ Studi lain oleh Shahbazi juga menggunakan NSE sebagai *biomarker* terjadinya diferensiasi sel MSC. Pada studi ini, sel UC-MSC dilakukan stimulasi diferensiasi dengan *cyclic adenosine monophosphate* (c-AMP) *elevating agent* yaitu forskolin dan *3-isobutyl-1-*

xanthine (IBMX). Analisis imunokimia dengan antibodi monoklonal NSE menunjukkan bahwa induksi dengan dua agen tersebut berhasil



menyebabkan diferensiasi sel UC-MSC dalam 8 jam yang ditandai dengan adanya peningkatan fluoresensi antibodi NSE pada kultur yang menunjukkan peningkatan ekspresi NSE pada sel UC-MSC yang berhasil berdiferensiasi. Ekspresi NSE juga berhasil dikonfirmasi dengan *western blot*.¹⁵⁷ Sebagai *biomarker*, NSE baik diamati pada 6-12 jam setelah terjadinya COT karena pada rentang waktu ini lah NSE mencapai puncak ekspresinya sebelum mengalami penurunan ekspresi dalam 24 jam.¹⁵⁸



Gambar 2 15. Diferensiasi MSC dan efek *secretome* pada SSP.¹⁵⁵

Selain peranannya sebagai molekul penting yang menilai secara langsung kerusakan pada neuron, NSE juga memiliki peran dalam proses perbaikan saraf. Diketahui bahwa NSE dapat mempengaruhi kelangsungan

neuron, diferensiasi, dan regenerasi neuron melalui aktivasi jalur PI3K/Akt dan MAPK/ERK. NSE berperan dalam aktivasi jalur PI3K/Akt yang menyebabkan terhambatnya enzim MEK (MAPK/ERK



kinase) dan PI3K sehingga berujung pada stimulasi pertumbuhan sel. Aktivitas neurotropik oleh NSE ini juga diperantarai oleh protease sistein yaitu cathepsin X (Cat X). Protease CatX ini dapat memotong bagian terminal-C dari suatu protein dan menurunkan aktivitasnya.¹⁵⁹ Selain itu P13K yang diaktivasi oleh NSE juga mempengaruhi RhoA kinase, suatu protein yang memiliki peran sebagai regulator utama perubahan struktur sitoskeleton aktin di dalam sel saraf. RhoA kinase dapat menstimulasi neurodegenerasi melalui penghambatan senyawa antiapoptosis yaitu Rac.^{160,161} NSE dan enolase lain juga diketahui memiliki peran dalam perubahan komposisi matriks ekstraselular. Enolase dapat mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin dan mengaktifkan MMP sehingga menyebabkan degradasi matriks ekstraselular dan kerusakan jaringan.¹⁶²

2.5.4 Studi Mengenai Pengaruh *Secretome* Terhadap NSE

Studi yang mempelajari perubahan ekspresi NSE serta efeknya terhadap perbaikan fungsi kognitif dan/atau jaringan saraf akibat paparan terhadap MSC dan/atau *secretome* MSC dirangkum dalam tabel 2.3.

Tabel 2 3. Studi yang mempelajari pengaruh *secretome* terhadap NSE.

Penulis (tahun)	Subjek	Model penyakit	Jenis MSC	Temuan
152	Manusia	COT	-	Terdapat korelasi negatif antara kadar NSE pada pasien pasca COT dengan kesadaran yang dinilai dengan <i>Glasgow Comma Scale</i> (GCS).



Penulis (tahun)	Subjek	Model penyakit	Jenis MSC	Temuan
Woertgen (2000). ¹⁶³	Tikus	COT	-	- Tikus yang diberikan perlakuan COT mengalami penurunan NSE secara bermakna dibandingkan kontrol. - NSE mencapai konsentrasi puncak pada 6 jam setelah perlakuan.
Woodbury (2000). ¹⁶⁴	<i>In vitro</i>	-	BM- MSC	Sel punca mesenkimal akan mengekspresikan banyak NSE di saat sel tersebut berdiferensiasi menjadi sel saraf.
Haque (2017). ¹⁶⁵	Tikus	SCI	-	- Inhibisi ekspresi NSE pada tikus model SCI mengurangi kadar sitokin proinflamasi dan aktivasi sel glial. - Inhibisi ekspresi NSE berpotensi sebagai terapi dan memperbaiki luaran cedera sistem saraf pusat.
Shahbazi (2016). ¹⁵⁷	<i>In vitro</i>	-	UC- MSC	NSE digunakan sebagai <i>biomarker</i> terjadinya diferensiasi sel MSC menjadi progenitor sel saraf.
Meric (2010). ¹⁵⁴	Manusia	COT	-	kadar serum NSE dapat memprediksi luaran neurologis buruk (GCS <3) dengan sensitivitas 87% dan spesifisitas 82,1%.
Cheng (2014). ¹⁵³	Manusia	COT	-	Pada penderita dengan COT, kadar NSE secara bermakna lebih tinggi pada penderita yang mengalami kematian (mean difference (MD) 0,28; interval kepercayaan 95% (IK95) 0,21 – 0,34; p <0,0001)
156	<i>In vitro</i>	-	BM- MSC	NSE berperan sebagai <i>biomarker</i> diferensiasi sel MSC



Penulis (tahun)	Subjek	Model penyakit	Jenis MSC	Temuan
				mRNA NSE diketahui diekspresikan lebih tinggi secara bermakna pada sel BM-MSC yang sudah terdiferensiasi menjadi sel saraf dibandingkan sel BM-MSC yang tidak berdiferensiasi
Hafner (2012). ¹⁶⁶	<i>In vitro</i>	-	-	NSE meningkatkan kesintasan sel saraf dan menginduksi pertumbuhan <i>neurite</i> melalui jalur PI3K/Akt dan MAPK/ERK
Sogut (2010). ¹⁶⁷	Manusia	COT	-	- Derajat keparahan klinis pasca cedera kepala tumpul berasosiasi bermakna dengan NSE - Skor GCS ≤ 8, usia muda, dan peningkatan kadar NSE merupakan prediktor bermakna mortalitas pasca COT.

NSE: *neuron-specific enolase* SCI: *spinal cord injury* MSC: *mesenchymal stem cell*; BM-MSC: *bone marrow MSC*; UC-MSC: *umbilical cord mesenchymal stem cell*; COT: cedera otak traumatik.



2.6 Eritropoetin

Eritropoetin, hormon glikoprotein dengan berat molekul 30,4 kDa, berperan penting sebagai regulator utama pembentukan sel darah merah, dipicu oleh penurunan oksigenasi jaringan.¹⁶⁸ Penelitian pada tahun 1977 berhasil memurnikan struktur asam amino EPO, dan gen EPO berhasil dikloning pada 1985. Mekanisme pengaturan ekspresi EPO terkait dengan identifikasi hypoxia-inducible factor (HIF-1) dan komponennya. Gen EPO, terletak pada kromosom 7 manusia (7pter-q22), mengandung 5 ekson dan 4 intron, dengan ekspresinya dipengaruhi oleh hidroksilasi asam amino prolin dalam HIF-1 α melalui interaksi dengan protein VHL, yang kemudian mengatur degradasi HIF-1 α .^{169,170}

Di samping perannya dalam hematopoiesis, EPO juga mempengaruhi sistem saraf. Meski ekspresi EPO dan EPOR pada otak orang dewasa normal rendah, keduanya meningkat signifikan sebagai respons terhadap cedera sel. EPO berkontribusi pada kelangsungan hidup, diferensiasi, dan maturasi neuron, glia, dan sel endotel serebrovaskular.¹⁷¹ EPO menunjukkan efek neurotropik pada neuron, bertindak sebagai faktor angiogenik pada jaringan otak, serta berperan dalam maturasi dan diferensiasi oligodendrosit dan astrosit, dengan efek antiapoptosis yang melindungi otak dari kerusakan hipoksia.^{172,173} Studi menunjukkan bahwa



an EPO secara sistemik mampu menembus sawar darah otak dan dalam mengurangi kerusakan sistem saraf pusat pasca stroke.^{174,175} In lebih lanjut mengungkapkan bahwa EPO meningkatkan ekspresi

BDNF dalam sel saraf dan plasma pada pasien dengan gangguan afektif, serta melindungi neuron hipokampus melalui mekanisme ini. EPO juga mempromosikan neurogenesis dan memfasilitasi migrasi neuroblast setelah kerusakan SSP, dengan mengatur kadar CXCR4/SDF-1.^{176,177}

Dalam konteks cedera otak, pengobatan dengan EPO terbukti mengurangi volume infark iskemik, kematian neuron, serta meningkatkan kelangsungan hidup neuron pada model hewan stroke.^{178,179} Penelitian pada tikus menunjukkan bahwa pemberian EPO secara intraperitoneal dengan yang optimal untuk efek neuroprotektif bervariasi, dengan dosis sedang 5000 IU/kg memberikan hasil terbaik.¹⁸⁰ Pada manusia, penelitian menyarankan bahwa dosis yang lebih rendah (500 unit/kg) dapat memberikan hasil yang lebih baik meski penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menentukan dosis optimal pada pasien dengan cedera otak traumatik.¹⁸¹

Pada penelitian pada tikus Wistar jantan dewasa, EPO menunjukkan efek yang bergantung pada dosis dalam mengurangi kerusakan neuron hipokampus, meningkatkan angiogenesis dan neurogenesis, serta memperbaiki fungsi sensorimotor dan pembelajaran spasial. Hasil ini menunjukkan bahwa dosis EPO yang moderat seperti 5000 U/kg memberikan manfaat lebih baik dibandingkan dengan dosis yang lebih rendah atau lebih tinggi.¹⁸⁰ Penelitian pada model hewan lain menunjukkan



pemberian EPO dalam waktu 6 jam setelah cedera otak silkan penurunan volume infark terbesar, perbaikan neuron di

hipokampus, dan peningkatan pemulihan fungsional. Beberapa penelitian setuju bahwa dosis 5000 IU/Kg secara intraperitoneal mampu menghasilkan keluaran neurologis yang lebih baik, namun dosis EPO secara intravena masih belum banyak dipelajari dan masih sangat bervariasi.¹⁷⁷ Suatu studi yang dilakukan oleh Massaro menunjukkan bahwa pemberian EPO secara intravena dengan dosis 1000 IU/Kg yang diberikan pada hari 1,2,3,5, dan 7 setelah tikus lahir secara signifikan meningkatkan konsentrasi BDNF dalam 24 jam.¹⁸² Regimen yang sama juga dilakukan oleh Wu pada studinya yang dirilis tahun 2016. Studi oleh Wu juga menunjukkan efek positif EPO terhadap fungsi motoris otak pasca trauma.¹⁸³

Sementara itu, pada manusia, dosis EPO yang disetujui untuk pengobatan cedera otak traumatik jauh lebih rendah dibandingkan dengan yang digunakan dalam penelitian pada hewan. Penelitian oleh Siren AL et al. (2009) menunjukkan bahwa dosis EPO sekitar 500 unit/kg, yang diberikan dalam waktu 8 jam setelah cedera otak dan dilanjutkan dengan lima dosis harian, dikaitkan dengan *biomarker* serum yang lebih rendah dan efek pemulihan fungsional yang lebih baik setelah 3 bulan perawatan. Namun, diperlukan investigasi lebih lanjut untuk menentukan apakah dosis EPO yang lebih tinggi dapat memberikan hasil klinis yang lebih baik.¹⁸¹

Kellert et al. mengindikasikan bahwa dosis injeksi EPO subkutan 5000 IU/kg tiga kali mungkin ekuivalen dengan dosis tunggal 15000 IU/kg. Mereka juga menemukan bahwa peningkatan dosis atau



durasi terapi tidak memberikan manfaat tambahan, yang menunjukkan adanya potensi batas atas dosis EPO yang dapat diterima. Hal ini menyoroti pentingnya menentukan dosis yang tepat dan durasi terapi EPO dalam pengobatan cedera otak traumatik, mengingat variasi respons terhadap EPO antara penelitian hewan dan manusia.¹⁸⁴

Penelitian yang dilakukan oleh Said, MF pada tahun 2021 menunjukkan efek neuroprotektif yang bermakna pada tikus yang diberikan EPO dibandingkan dengan tikus kontrol yang diberikan placebo. Pada penelitian ini, tikus Sprague Dawney diberikan perlakuan cedera otak traumatik dengan metode Marmarou modifikasi. Pada kelompok perlakuan, EPO diberikan dengan dosis 30.000 IU/KgBB secara subkutan pada 30 menit pasca-cedera otak. Penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok tikus yang diberikan EPO mengalami peningkatan mRNA BDNF yang lebih tinggi pada sesaat setelah diberikan cedera otak, 12 jam, dan 24 jam pasca cedera otak traumatik bila dibandingkan tikus yang diberikan placebo. Selain itu, tikus EPO juga mengalami peningkatan serum SDF-1 yang bermakna mulai dari 12 jam pasca cedera otak. Disisi lain, tikus placebo justru mengalami penurunan konsentrasi serum SDF-1 pasca trauma otak seiring berjalannya waktu. Terakhir, pemberian EPO pada tikus model cedera otak juga berhasil menekan ekspresi NSE sehingga tikus pada kelompok ini memiliki konsentrasi NSE yang lebih rendah dibandingkan tikus

yang diamati mulai dari 12 jam pasca trauma. Pada pemeriksaan otak setelah terminasi tikus, kelompok EPO memiliki jumlah sel



PMN yang lebih sedikit dibandingkan tikus placebo namun tidak memiliki jumlah limfosit yang berbeda secara signifikan.¹⁷⁷

2.7 COT dan Perubahan Histopatologi Jaringan Otak dengan Pewarnaan *Hematoxylin and Eosin* (H&E)

Pada kasus cedera otak, gangguan langsung dan sekunder dari BBB timbul sebagai dampak dari perturbasi yang kompleks pada integritas membran basal kapiler.¹⁸⁵ COT seringkali menimbulkan infiltrasi sel-sel imun perifer seperti neutrofil, monosit, dan limfosit serta meningkatkan aktifitas mikroglia akibat gangguan BBB, yang memicu kaskade respon inflamasi.¹⁸⁶ Banyak studi menunjukkan bahwa leukosit memiliki peran besar dalam pathogenesis cedera otak akut. Leukosit terutama neutrofil akan mengeluarkan sitokin proinflamasi, protease, dan radikal bebas yang dapat memulai dan memperparah kerusakan jaringan. Perekrutan leukosit ke otak orang dewasa yang mengalami trauma terjadi sebagai respons terhadap aktivasi komplement dan bertepatan dengan gangguan sawar darah otak.^{187,188}

Trauma akut pada otak akan memicu aktivasi mikroglia dan memicu pelepasan sitokin proinflamasi lokal pada jaringan otak. Studi menunjukkan bahwa neutrofil dapat merangsang rekrutmen dan aktivasi makrofag di jaringan perifer.¹⁸⁹ Penelitian menunjukkan bahwa Aktivasi mikroglial/makrofag diketahui kurang kuat pada tikus an dengan kondisi neutropenia sehingga menunjukkan adanya



hubungan antara rekrutmen neutrofil dengan aktivasi sel fagosit di otak.¹⁹⁰ Hubungan ini juga diamati di hipokampus yang menunjukkan adanya penurunan aktifitas apoptosis yang dipicu oleh sel mikroglia pada jaringan dengan infiltrasi PMN yang berkurang. Pada penelitian lain menunjukkan bahwa pada tikus model perdarahan intraserebral pada tikus kondisi neutropenia atau sel neutrofil yang kurang pada aliran darah akan menyebabkan penurunan jumlah mikroglia atau makrofag yang teraktivasi pada hari ke-7 dan ke-14 pasca cedera.¹⁹¹

Apabila terjadi cedera, neutrofil akan dengan cepat bergerak menuju tempat cedera sebagai lini pertama pertahanan. Pada pasien sehat, infiltrasi neutrofil di SSP sangat terbatas akibat BBB yang masih sehat dan intak.¹⁹² Kerusakan BBB setelah cedera otak akan meningkatkan infiltrasi neutrofil sepanjang arterior dan venula serebral segera setelah 5 menit pasca cedera. Neutrofil yang menginfiltrasi tersebut kemudian akan mulai mengisi ruang subaraknoid dan subdural dalam waktu 4 jam. Infiltrasi neutrofil ke parenkim kortikal dan subkortikal akan terjadi setelah beberapa hari setelah mengalami cedera.¹⁹³ Setelah mengalami cedera, dalam dua jam neutrofil akan ditemukan berkumpul pada mikrovaskular yang kemudian akan menstimulasi agregasi makrofag dalam 24 jam. Histopatologi jaringan menunjukkan adanya akumulasi sel limfosit T dalam 2-3 hari setelah cedera.^{187,194–196}



alam penelitian yang menggunakan model COT, pengkajian peran sebagai respon cedera dapat diambil dalam 24 jam pasca cedera.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa COT dapat mengakibatkan akumulasi PMN hingga sebanyak $174,7 \pm 10,7$ sel/bidang.¹⁸⁷ Penelitian lain menunjukkan bahwa agregrasi sel neutrofil pasca cedera otak ini tidak terjadi dengan jelas di bagian hipokampus.¹⁹⁷

Beberapa *biomarker* diketahui berpengaruh terhadap derajat agregrasi sel imun di jaringan otak pasca mengalami cedera. Dalam penelitiannya, Takeda melaporkan bahwa kadar BDNF yang meningkat akan berbanding terbalik dengan jumlah sel neutrofil yang menempel pada endotel mikrovaskular manusia (HMVECs).¹⁹⁸ BDNF diketahui memiliki sifat anti inflamasi yang dicapai melalui penurunan rekrutmen neutrofil yang dimediasi melalui perubahan ekspresi ICAM-1. Disisi lain, aktifitas NSE berbanding lurus dengan derajat inflamasi jaringan otak. Studi menunjukkan bahwa kadar NSE yang berkurang dapat menurunkan kadar sitokin proinflamasi, menghambat aktivitas MMP-9, dan mengurangi gliosis setelah cedera otak.¹⁵⁹ SDF-1 adalah kemokin yang memediasi mobilisasi dan migrasi sel induk hematopoietik leukosit yang secara alami terekspresikan di dalam sumsum tulang sebagai faktor penghambat proliferasi dan perkembangan bakal calon neutrofil matang.¹⁹⁹ Pada kondisi inflamasi, kadar SDF-1 pada sumsum tulang akan berkurang sehingga PMN dapat dilepaskan ke sirkulasi sistemik menuju lokasi yang mengalami radang.²⁰⁰ Penelitian oleh Sun menunjukkan bahwa SDF-1 memiliki sifat



imasi dengan menghambat banyak ekspresi sitokin proinflamasi k IL-6, IL-1 β , dan TNF- α .²⁰¹

2.8 Pemberian Perlakuan COT pada Hewan Coba (Tikus)

Dalam meneliti patofisiologi dari COT yang sangat beragam dan kompleks, sudah banyak sekali metode yang dikembangkan untuk membuat model hewan yang dapat mewakili kondisi COT pada manusia. Walaupun banyak hewan dengan ukuran dan fisiologi yang lebih mendekati manusia, tikus dan hewan pengerat sejenis paling banyak digunakan sebagai subjek penelitian karena ukurannya yang kecil, harga yang terjangkau, dan pemeriksaannya yang sudah terstandarisasi. Pemberian perlakuan cedera otak pada tikus pun sudah sangat bervariasi dengan karakteristik cedera dan keuntungan serta kerugiannya masing-masing. Pemberian cedera otak pada tikus terdiri dari empat kelompok utama yaitu *fluid percussion injury* (FPI), *controlled cortical impact injury* (CCI), *blast injury*, dan *weight drop–impact acceleration injury*.²⁰²

Pemberian cedera menggunakan teknik FPI dilakukan dengan pendulum yang membentuk reservoir cairan untuk menghasilkan gelombang tekanan pada duramater yang intak pada tikus yang sudah dilakukan kraniotomi. Pemberian cedera melalui teknik FPI ini dapat dilakukan pada garis tengah otak atau secara lateral melalui tulang parietal.

Cedera FPI dapat memberikan COT pada tikus tanpa menyebabkan fraktur



sehingga kurang menggambarkan kondisi COT derajat menengah atau berat di manusia yang sering disertai fraktur tulang tengkorak dan

kontusi di banyak girus. Selain itu, model FPI memerlukan adanya kraniotomi pada tikus sehingga risiko kematian hewan coba tergolong tinggi.^{202,203}

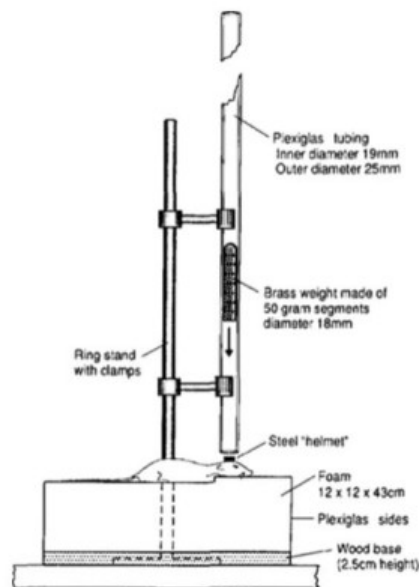
Pemberian cedera dengan metode CCI dilakukan dengan menggunakan alat penumbuk elektromagnetik yang melakukan tumbukan pada duramater utuh pada tikus yang sudah dikraniotomi. Model CCI ini dapat menirukan kondisi kehilangan jaringan kortikal, hematoma subdural akut, kontusi, cedera aksonal, disfungsi BBB, hingga kondisi koma.²⁰⁴ Cedera otak melalui CCI ini dilaporkan terjadi secara difus yang mencakup cedera korteks, hipokampus, hingga degradasi talamus.²⁰⁵ Keuntungan utama dari CCI adalah metode yang mudah untuk direplikasi dan parameter cedera seperti kecepatan, waktu, dan kedalaman tumbukan yang bisa diatur. Kelemahan utama adalah dibutuhkannya kraniotomi yang beresiko menyebabkan kematian hewan coba.²⁰²

Beberapa model tikus diberikan cedera otak melalui ledakan (*blast injury*) untuk menirukan kondisi COT pada personil militer yang mengalami hantaman ledakan pada kepala tanpa mengalami cedera eksternal. Penelitian oleh Long telah mempelajari efek fisiologis, neuropatologi, dan perilaku kognitif pada tikus yang diberikan cedera ledakan.²⁰⁶ Selain itu model tikus cedera ledakan juga sering digunakan untuk menilai efektivitas bahan pelindung seperti kevlar. DeWitt melaporkan bahwa tikus yang

ji oleh kevlar pada regio toraks dan abdomen mengalami cedera difus yang lebih rendah.²⁰⁷



Pemberian cedera dengan metode *weight drop–impact acceleration injury* dilakukan dengan memberikan tumbukan melalui beban yang diterjunkan secara bebas terarah pada tikus dengan tulang tengkorak yang terekspos dengan atau tanpa kraniotomi. Terdapat empat model utama untuk jenis cedera ini yaitu model Feeney, Shohami, Maryland, dan Marmarou. Model Feeney dan Shohami berfokus pada pemberian COT yang bersifat fokal sedangkan Maryland dan Marmarou memberikan cedera yang cenderung bersifat difus.²⁰² Pada laporan penelitian orisinil oleh Marmarou pada tahun 1994, mereka melaporkan pemberian cedera pada tikus menggunakan alat khusus (gambar 2.17).



Gambar 2 16. Alat pemberi cedera otak oleh Marmarou.



Pada alat ini, beban dapat diatur beratnya untuk memberikan gaya 50 hingga 500 gram. Melalui pipa kaca, beban akan jatuh bebas ketinggian 2 meter menuju tikus yang dipakaikan helm yang terbuat

dari *stainless-steel* berdiameter 10 mm dengan tebal 3 mm. Helm ini terfiksasi pada bagian tengah tengkorak di antara sutura koronal dan lambdoid. Pada saat pemberian cedera, tikus berada dalam posisi *prone* di atas alas yang terbuat dari busa (*foam*) yang terbungkus dalam *plexiglas*.²⁰⁸ Model Marmarou akan memberikan cedera yang bersifat difus pada tikus dan dapat menyebabkan DAI terutama di regio korpus kalosum, kapsula interna, traktur optik, pedinkulus serebri dan serebelli, hingga batang otak. Keuntungan utama model *weight drop–impact acceleration injury* ini adalah prosesnya yang mudah untuk direplikasi dan cenderung memiliki beban biaya penelitian yang lebih ringan.²⁰²

Dalam memberikan cedera menggunakan model Marmarou, derajat COT yang berbeda dapat diberikan dengan menyesuaikan beban dan ketinggian awal. Dalam laporannya, Marmarou menyimpulkan bahwa beban terberat yang bisa diberikan pada tikus untuk memicu COT derajat berat tanpa menyebabkan kematian tikus adalah dengan menggunakan beban 450 g dengan ketinggian awal 1 meter.²⁰⁸ Modifikasi dari model ini dikembangkan oleh Nasution pada tahun 2020 dengan harapan dapat mempermudah peneliti dari negara berkembang dan memiliki fasilitas minim untuk melakukan penelitian mengenai COT. Pada teknik yang dimodifikasi ini, beban yang digunakan lebih ringan yaitu 20 gram dengan ketinggian awal 20 cm yang diberikan pada tikus berusia 10-12 minggu dan

dan 200-300 gram. Temuan histologi pada laporan ini menunjukkan bukti terjadinya cedera otak sekunder dan proses inflamasi difus.



Beban yang diberikan pada tikus pada model modifikasi Nasution setara dengan hantaman seberat 3-5 kg pada manusia.²⁰⁹ Belum ada penelitian yang secara sederhana memberikan panduan mengenai berat dan ketinggian tertentu yang dibutuhkan untuk memberikan COT dengan derajat tertentu. Penelitian oleh Rohadi pada tahun 2023 menemukan bahwa semakin besar beban trauma, maka akan semakin besar pula persentase inflamasi pada jaringan otak, di mana rerata persentase inflamasi pada beban 20 gram, 40 gram, 60 gram dan 80 gram masing-masing adalah 3%, 4,8%, 5%, dan 12%.²¹⁰ Penelitian oleh Li pada tahun 2011 justru melaporkan bahwa beban yang digunakan tidak memiliki korelasi yang kuat dengan derajat cedera otak yang diukur sebagai banyaknya *traumatic axonal injury* (TAI). Penelitian oleh Li ini menyatakan bahwa rerata percepatan linear lah yang memiliki korelasi kuat dengan angka TAI dengan model yang mereka buat memiliki koefisien regresi (R^2) sebesar 0,612.²¹¹

2.9 Pemeriksaan Fungsi *Neurobehavioral* Tikus

Pemeriksaan *neurobehavioral* pada tikus dapat menggunakan metode *neurological severity score* (NSS). Metode evaluasi ini dirancang khusus untuk mengukur tingkat keparahan cedera saraf pada tikus (gambar 2.18).



ini mengkategorikan pemeriksaan menjadi empat bagian utama, motor, sensorik, keseimbangan pada balok, serta refleks dan kranial abnornal.²¹²

Pada bagian motor, tikus akan dites melalui beberapa tindakan. Pertama, tikus akan diangkat dengan ekornya dan respons dari tikus akan dievaluasi. Misalnya, jika tikus menunjukkan fleksi pada anggota gerak depannya, hal tersebut mengindikasikan adanya masalah pada sistem motoriknya. Selain itu, evaluasi gerakan kepala lebih dari 10° terhadap sumbu vertikal dalam waktu 30 detik juga menjadi indikator penting. Kemudian, tikus akan diletakkan di lantai dan obeservasinya berkaitan dengan kemampuan berjalan tikus. Apakah tikus mampu berjalan dengan normal atau menunjukkan ketidakmampuan berjalan lurus, berputar ke sisi tertentu, atau bahkan jatuh.²¹²



	Points
Motor tests	
Raising rat by the tail	3
1 Flexion of forelimb	
1 Flexion of hindlimb	
1 Head moved $>10^\circ$ to vertical axis within 30 s	
Placing rat on the floor (normal=0; maximum=3)	3
0 Normal walk	
1 Inability to walk straight	
2 Circling toward the paretic side	
3 Fall down to the paretic side	
Sensory tests	2
1 Placing test (visual and tactile test)	
2 Proprioceptive test (deep sensation, pushing the paw against the table edge to stimulate limb muscles)	
Beam balance tests (normal=0; maximum=6)	6
0 Balances with steady posture	
1 Grasps side of beam	
2 Hugs the beam and one limb falls down from the beam	
3 Hugs the beam and two limbs fall down from the beam, or spins on beam (>60 s)	
4 Attempts to balance on the beam but falls off (>40 s)	
5 Attempts to balance on the beam but falls off (>20 s)	
6 Falls off: No attempt to balance or hang on to the beam (<20 s)	
Reflexes absent and abnormal movements	4
1 Pinna reflex (head shake when touching the auditory meatus)	
1 Corneal reflex (eye blink when lightly touching the cornea with cotton)	
1 Startle reflex (motor response to a brief noise from snapping a clipboard paper)	
1 Seizures, myoclonus, myodystony	
Maximum points	18
One point is awarded for the inability to perform the tasks or for the lack of a tested reflex; 13 to 18 indicates severe injury; 7 to 12, moderate injury; 1 to 6, mild injury.	

Gambar 2 17. Skoring NSS

Untuk pemeriksaan sensorik, terdapat dua tes utama. Pertama, tikus diberikan rangsangan visual dan taktil untuk melihat responsnya. Kedua, proprioseptif dilakukan dengan mendorong cakar tikus ke tepi meja merangsang otot-ototnya, dan respons tikus akan diamati.²¹²



Pemeriksaan selanjutnya adalah tes keseimbangan pada balok. Dalam tes ini, kemampuan tikus untuk menjaga keseimbangannya pada balok akan dievaluasi. Ada berbagai skenario, seperti tikus yang dapat menjaga keseimbangannya dengan postur stabil, atau tikus yang mencoba menjaga keseimbangannya namun jatuh dalam waktu tertentu.²¹²

Terakhir, pemeriksaan refleks dan pergerakan abnormal melibatkan sejumlah tes seperti refleks pinna, di mana respons tikus saat mendekati telinga luar akan diamati. Refleks kornea dievaluasi dengan menyentuh kornea tikus dengan kapas, dan respons tikus terhadap suara tiba-tiba, seperti suara dari papan klip, juga akan diamati. Refleks seperti spasme, mioklonus, dan miyodiston juga dicatat.²¹²

Dalam total keseluruhan, skor maksimum yang dapat diperoleh adalah 18 poin. Skor yang lebih tinggi mengindikasikan cedera yang lebih parah. Sebagai contoh, skor antara 13 hingga 18 mengindikasikan cedera parah; 7 hingga 12 menunjukkan cedera sedang; sedangkan 1 hingga 6 mengindikasikan cedera ringan. Dengan metode NSS ini, peneliti dapat mengukur dan membandingkan tingkat keparahan cedera neurologis pada tikus dengan lebih akurat dan sistematis.²¹²





Optimized using
trial version
www.balesio.com