

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, kasus cedera otak di Indonesia mencapai 11,9% dari total kasus trauma, dengan 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 tegangan dapat menyebabkan proses katabolik intraseluler (*autodigestion*). Ion Ca^{2+} 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 traumatik kronis dan penyakit Alzheimer di masa mendatang.¹¹

Berbagai pendekatan terapeutik telah diterapkan dan dikembangkan dalam penatalaksanaan COT. Salah satunya yang saat ini sedang berkembang adalah penggunaan *mesenchymal stem cells* (MSC). Aplikasi MSC pada lokasi COT dan 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 sebagai modalitas penatalaksanaan karena sel ini sulit untuk disimpan dalam 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 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 menjadi pilihan terapi yang menjanjikan bagi penderita COT, terutama untuk 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

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 mastikan 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 mengalami 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

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 mekanisme cedera dan mempelajari suatu bagian spesifik dari mekanisme bagaimana 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 dikembangbiakkan 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.²³ 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.

Oksidatif stres sering digambarkan sebagai fenomena self-propagating berdasarkan pengamatan bahwa ketika pelepasan ROS berlebihan yang diinduksi oksidatif stres memicu kerusakan sel, makromolekul yang rusak itu sendiri dapat berperilaku sebagai dan/atau menjadi ROS. Akibatnya, otak, dengan kandungan kaya lemak, permintaan energi yang tinggi, dan kapasitas antioksidan yang lemah menjadi sasaran dari kerusakan oksidatif yang berlebihan.⁵ Oksidatif stres menyebabkan peningkatan produksi produk peroksidase lemak, salah satunya 2 isoprostane, yang juga dapat menyebabkan pensinyalan abnormal.^{6,7}



F2 isoprostane merupakan salah satu produk sekunder atau produk akhir dari peroksidase lemak yang dibentuk dari dekomposisi asam arakidonat dan PUFA yang lebih besar. Karena F2 isoprostane adalah salah satu penanda paling populer dan andal yang menentukan oksidatif stres dalam situasi klinis, dan karena reaktivitas dan toksisitas F2 isoprostane yang tinggi mendasari fakta bahwa molekul ini sangat relevan dengan komunitas penelitian biomedis.⁸

F2-isoprostan mewakili sekelompok senyawa mirip prostaglan senyawa mirip din yang dihasilkan dari asam arakidonat sebagai hasil peroksidasi. Peningkatan kadar F2-isoprostan telah dilaporkan dalam berbagai penyakit manusia, termasuk penyakit kardiovaskular seperti iskemia dan aterosklerosis, penyakit rosis, penyakit paru-paru seperti asma dan penyakit paru obstruktif kronik, dan penyakit paru obstruktif kronik, dan penyakit neurologis seperti seperti penyakit Alzheimer dan multiple sclerosis.⁸¹ Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa cedera otak meningkatkan kadar F2-isoprostane baik dalam CSF dan serum pasien TBI Sebagai contoh, Varma et al.⁸⁵ menunjukkan bahwa pada anak-anak yang mengalami TBI parah, tingkat F2- isoprostane meningkat 6 kali lipat dibandingkan dengan itu diamati pada kontrol yang tidak terluka. Penanda ini ditemukan berkorelasi dengan baik dengan munculnya NSE, yang selanjutnya mendukung mendukung penggunaannya sebagai indikator kerusakan otak. Pada orang dewasa bias gender ditemukan pada laki-laki yang memiliki sekitar dua kali lipat kadar CSF F2-isoprostane dibandingkan perempuan, dan hanya laki-laki yang mengalami penurunan kadar metabolit lipid ini sebagai respons terhadap hipotermia.⁸⁶ Perbedaan dalam peroksidasi lipid ini telah diusulkan menjadi alasan potensial untuk perlindungan saraf yang lebih besar terlihat pada wanita daripada di laki-laki. Meskipun kadar F2-isoprostan telah disebut "standar emas" peroksidasi lipid, penentuan tingkatnya membutuhkan peralatan khusus, sehingga membatasi sehingga membatasi kegunaan klinisnya.

Maka dari itu, penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh pemberian *secretome* UC-MSC terhadap perubahan kadar F2 isoprostane, pada tikus *Sprague-Dawley* model cedera otak.



1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dari latar belakang tersebut maka dapat dirumuskan beberapa dari penelitian ini adalah bagaimana efek *secretome* UC-MSc terhadap perubahan kadar F2 isoprostane pada serum hewan coba yang mengalami COT?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui peran pemberian *secretome* UC-MSc terhadap perubahan kadar F2 isoprostane, pada hewan coba yang mengalami COT.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Diketuainya efek pemberian *secretome* UC-MSc dalam perubahan kadar F2 isoprostane pada hewan coba yang mengalami COT.
2. Diketuainya efek pemberian *secretome* UC-MSc dalam perubahan skor NSS pada hewan coba yang mengalami COT.
3. Diketuainya hubungan antara perubahan kadar F2 isoprostane dengan skor NSS pada hewan coba yang mengalami COT.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat akademik dan ilmu pengetahuan.

1. Menjadi dasar ilmu untuk pengembangan penelitian di masa mendatang mengenai *secretome* UC-MSc dan neurotrauma dari sudut ilmu dasar maupun klinis.
2. Memberikan informasi tambahan tentang peran *secretome* UC-MSc dalam prognosis COT.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Cedera Otak Traumatik (COT)

2.1.1 Definisi Cedera Otak Traumatik (COT)

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.²⁴ 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.²⁵

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.²⁶

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 ini cedera otak tiap tahunnya dengan angka mortalitas sebesar 35-40%.⁴ Asia, data mengenai insiden cedera kepala dikumpulkan oleh direktorat statan 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 kecelakaan kembali meningkat menjadi 33.827 kasus dengan jumlah kematian sebesar 34,4%.⁵ Menurut data dari Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 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%.²⁷ 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 antara lain fraktur tulang kepala, pendarahan ekstrakranial, pendarahan intrakranial, dan laserasi korteks serebri.



primer dapat dikatakan sebagai cedera difus apabila kerusakan yang menyeluruh pada otak. Cedera difus umumnya bersifat makroskopik yang p 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

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.²⁸ 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.²⁹ 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 yang bertabrakan keras dengan tulang tengkorak.²⁹ Berbeda dengan cedera otak fokal, cedera otak difus terjadi akibat gaya non-kontak berupa percepatan atau perlambatan pergerakan badan yang sangat cepat sehingga menyebabkan terjadinya cedera goresan (*shearing*) dan penarikan (*stretching*) jaringan serebral. Gaya tarikan yang kuat ini dapat mencederai akson, droisit, dan pembuluh darah sehingga menyebabkan edema otak dan aringan otak.³⁰ 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.³¹

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).^{8,32}

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

a. *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.³³ Peningkatan kadar asam amino neurotransmitter eksitatoris ini berakibat pada peningkatan aktivasi reseptor inotropik dan metabotropik.³⁴ Berbeda dengan reseptor inotropik,

glutamat metabotropik yang teraktivasi oleh ligannya (glutamat) akan mengaktifkan jalur *phospholipase C/inositol-1,4,5-triphosphate* yang akan menyebabkan pengeluaran ion Ca^{2+} dari gudang penyimpanannya di retikulum endoplasma. Aktivasi dari reseptor inotropik dan metabotropik glutamat akan

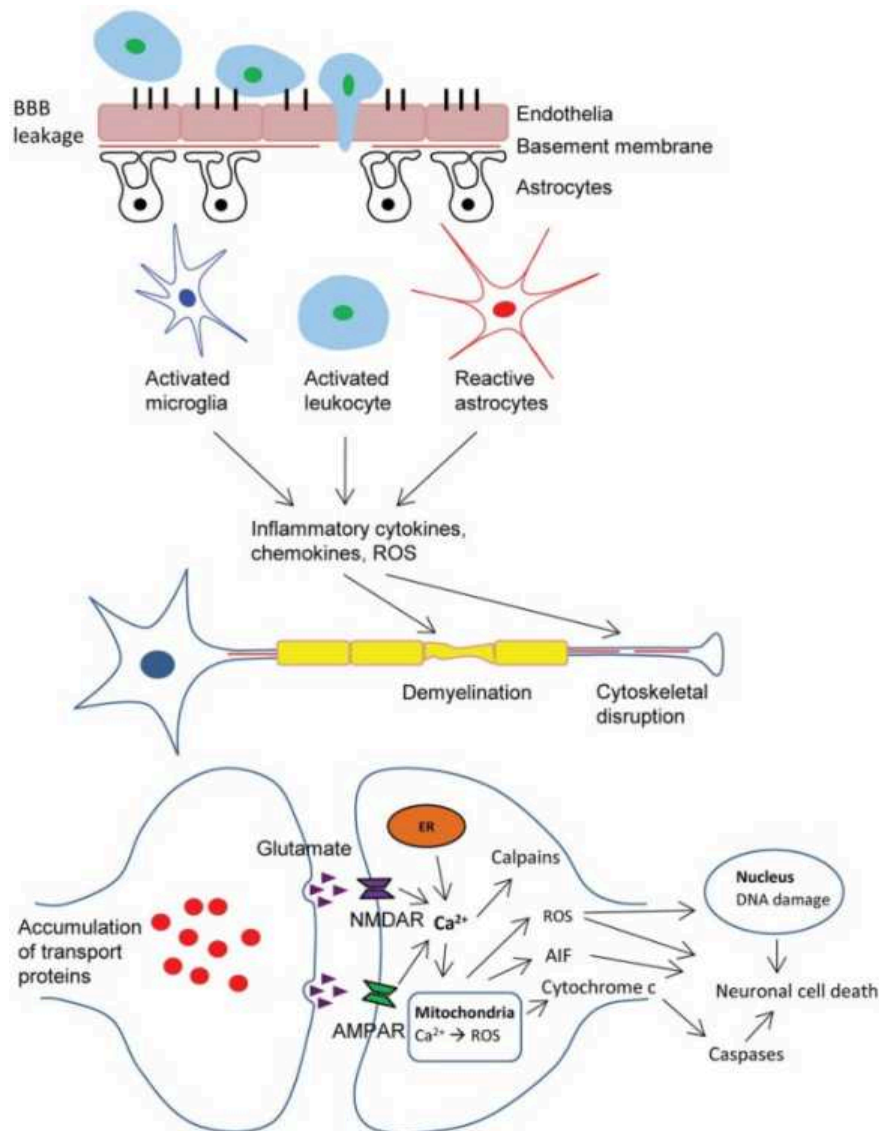


menyebabkan *excitotoxicity* yang berujung pada peningkatan kadar ion Ca^{2+} di dalam sel saraf.³⁵ Peningkatan ion ini akan mengaktifkan berbagai jasad yang dapat menimbulkan disfungsi mitokondria, stres oksidatif, hingga apoptosis sel melalui aktivasi *calcineurin*, *calpain*, dan *caspases*.^{8,34–38}

b. Disfungsi Mitokondria

Disfungsi mitokondrial 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 sehingga menyebabkan depolarisasi membran mitokondria, produksi ROS, dan 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 Selain itu, beberapa studi juga menunjukkan adanya perubahan konformasi dan aktivasi beberapa protein membran mitokondria seperti *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP) yang meningkatkan permeabilitas dari mitokondria.³⁹ 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.⁴⁰





Gambar 1. Patofisiologi dari cedera otak sekunder yang melibatkan kerusakan pada blood-brain barrier (BBB), inflamasi, stres oksidatif, dan excitotoxicity.³²

3. *Reactive Oxygen Species (ROS)* 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 aktivitas enzim, peningkatan aktivitas neutrofil, *excitotoxicity*, dan disfungsi mitokondria.⁸ Stimulasi reseptor NMDA oleh glutamat yang berlebihan serta masuknya ion Ca²⁺ yang terjadi akibat *excitotoxicity* diketahui dapat mengaktifkan



enzim *nitric oxide synthases* (NOS) yang berperan dalam produksi nitrit oksida (NO).^{34,41} Reaksi antara ROS dan NO akan menghasilkan *peroxynitrite* (PN) yang dapat menyebabkan cedera oksidatif pada banyak struktur sel termasuk di antaranya menyebabkan nitrasi protein dan kerusakan struktural *deoxyribonucleic acid* (DNA).⁴² Proses yang sama juga terjadi pada penyakit saraf kronis degeneratif seperti terbentuknya *lewy body* pada penderita demensia.⁴³ Molekul ROS lain selain PN seperti ion hidroksil radikal (OH⁻) dan superoksida (O₂⁻) 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*.⁴⁴

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 Ca²⁺ 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 memiliki efek jangka panjang seperti penurunan plastisitas otak, aliran darah ke otak, dan imunosupresi.⁴⁵

4. *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, dan limfosit untuk masuk ke SSP menuju parenkim otak yang mengalami sel darah putih dan imun tersebut akan memulai proses inflamasi melalui sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6 dan TNF- α . Peningkatan ekspresi SSP yang berkepanjangan diasosiasikan dengan gangguan permeabilitas



BBB, edema otak, dan defisit neurologis.^{8,46} Sitokin TNF- α juga dapat berikatan dengan protein *caspase* dan berperan penting dalam menyebabkan apoptosis sel.⁴⁶ 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.⁴⁶ 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 mikroglia dapat mensekresikan sitokin proinflamasi sebagai respon dari cedera, 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.⁴⁷

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-ceder. Fungsi utama neutrofil adalah mengendalikan lesi cedera dan menghilangkan debris seluler. Namun, neutrofil at memperburuk cedera otak dengan efek toksik langsung dari *matrix oteinases* (MMPs), *reactive oxygen species* (ROS), dan TNF α , serta atkan permeabilitas vaskular dan pembentukan edema. Monosit an 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 *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*. Selain itu, mikroglia dan juga dapat memberikan efek sitotoksik melalui produksi ROS, NO, dan sitokin proinflamasi.⁴⁸ Imunitas bawaan dapat terjadi dengan durasi hingga 4-7 hari setelah terjadinya COT.⁴⁹

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.⁴⁸ Beberapa protein spesifik SSP seperti *glial fibrillary acidic protein (GFAP)*, *myelin basic protein (MBP)*, *myelin oligodendrocytes glycoprotein (MOG)*, *myelin-associated glycopeptide (MAG)* akan menyebabkan reaksi imun yang dianggap sebagai antigen asing pada jaringan lain selain SSP, suatu yang dinamakan autoimunitas.⁵⁰⁻⁵² Antigen SSP yang tersebar pada 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. Temuan yang bervariasi ini disebabkan oleh berbagai luasnya jaras imunitas adaptif dengan tiap jaras spesifik yang melibatkan *subset* populasi sel T yang berbeda akan memberikan luaran yang berbeda pula.⁴⁸ 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.⁵³ 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.⁵⁴ 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.⁵⁵

5. 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 sitoskeleton akson yang terdiri dari jaringan longitudinal dari neurofilamen dan mikrotubul.⁵⁶ 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 dan akumulasi vesikel transport akson di ujung sinaps. Kerusakan transport pada ujung sinaps dapat menyebabkan *retraction bulbs* yang dapat memutuskan hubungan antar sel saraf. Terbentuknya *retraction bulb* dan penumpukan 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*.⁵⁷

6. 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 diaktifkan 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.⁵⁸ 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

7. Edema serebri

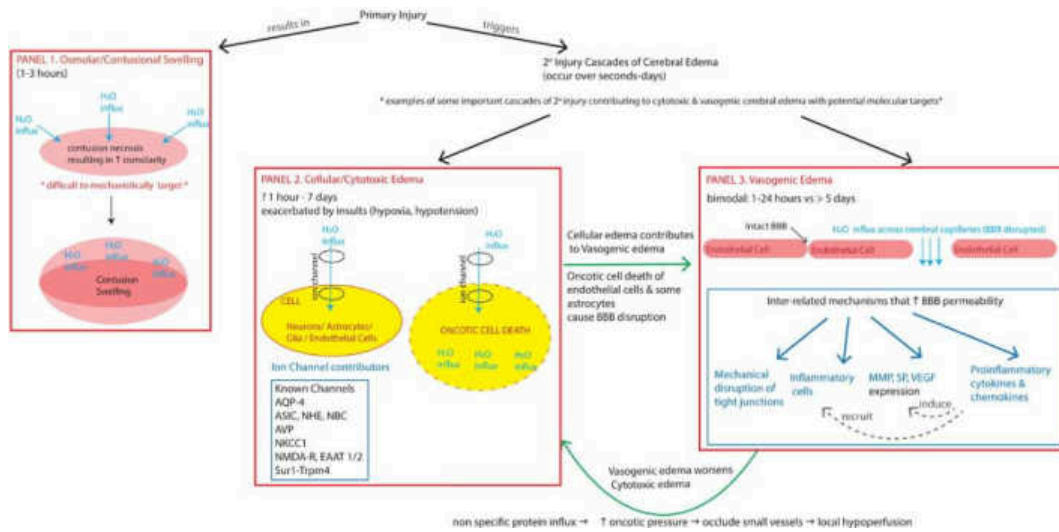
Edema pada jaringan saraf pusat terutama pada serebrum dapat terjadi setelah COT akibat dari perkembangan inflamasi yang terjadi pasca trauma. Edema serebri didefinisikan sebagai peningkatan komposisi air di jaringan otak dalam sel maupun di jaringan interstitial. Edema serebri dan peningkatan intrakranial dapat terjadi dalam 24-48 jam pascatrauma/jejas dan i titik maksimalnya dalam 3-5 hari setelah pajanan.⁵⁹ Pada pasien dengan 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.⁶⁰ 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.⁶¹

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.⁶² 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 berlebihan ke dalam ruangan intraselular dapat menyebabkan kematian sel.⁶² Masuknya air ke dalam sel tidak menambah total cairan jaringan otak karena hanya merupakan proses redistribusi air. 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.^{62,63} Edema vasogenik terjadi akibat meningkatnya kebocoran cairan di dalam pembuluh darah menuju cairan interstitial. Pada pasien COT, edema vasogenik terjadi terutama akibat kerusakan BBB dan neuroinflamasi yang meningkatkan permeabilitas pembuluh darah.⁶²





Gambar 2. Patofisiologi edema serebri

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

2.2.1 Definisi (UC-MSC)

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*.⁶⁴ 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 dari tali pusar, atau UC-MSC, jika dibandingkan dengan sel MSC yang dari sumber lain. Salah satu aspek yang paling menonjol dari UC-MSC metode pengambilan sel yang bersifat non-invasif. Dalam konteks ini, isolasi sel MSC dari tali pusar dilakukan dengan cara yang 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 terapi untuk COT, dan mengatasi tantangan-tantangan ini merupakan langkah 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



itu, tantangan berikutnya adalah mendesain dan melaksanakan uji klinis efektif, untuk memverifikasi keamanan dan efektivitas *secretome* UC-MSC terapi COT. Uji klinis ini harus dirancang dengan standar tinggi dan dalam 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 ini.²²

2.2.2 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 konsentrasi 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.⁶⁵ 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.⁶⁶

Efektifitas pemberian agen terapeutik kedalam tubuh banyak sekali memiliki tantangan tersendiri seperti jangka waktu efektifitasnya yang pendek, kelarutan yang buruk, agen yang terlalu cepat dikeluarkan dari sistem tubuh melalui sistem ekskresi, kemampuan menarget yang buruk, dan efek samping toksisitas pada jaringan yang sehat. Untuk membuat agen terapeutik dapat sampai ketempat



dan dengan akurat dan tetap mempertahankan efektifitasnya, agen tersebut akan mekanisme yang memungkinkan agen dikirim ke jaringan tujuan aman dan tepat sasaran. Pemberian obat/agen dengan sel MSC menjadi 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 dipermukaannya, akan bermigrasi menuju tempat dengan cedera atau inflamasi. Sel ini juga mudah diberikan pada pasien melalui berbagai cara seperti injeksi sistemik dan pemberian topikal.⁶⁷

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 di keluarkan 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* MSC, obat atau agen dapat didesain khusus agar dapat menempel pada suatu 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 diantara lain metode elektroporasi dan transfeksi *liposome-based* namun metode ini cenderung “agresif” dan berisiko mengurangi kesintasan sel MSC di dalam tubuh pasien.⁶⁷

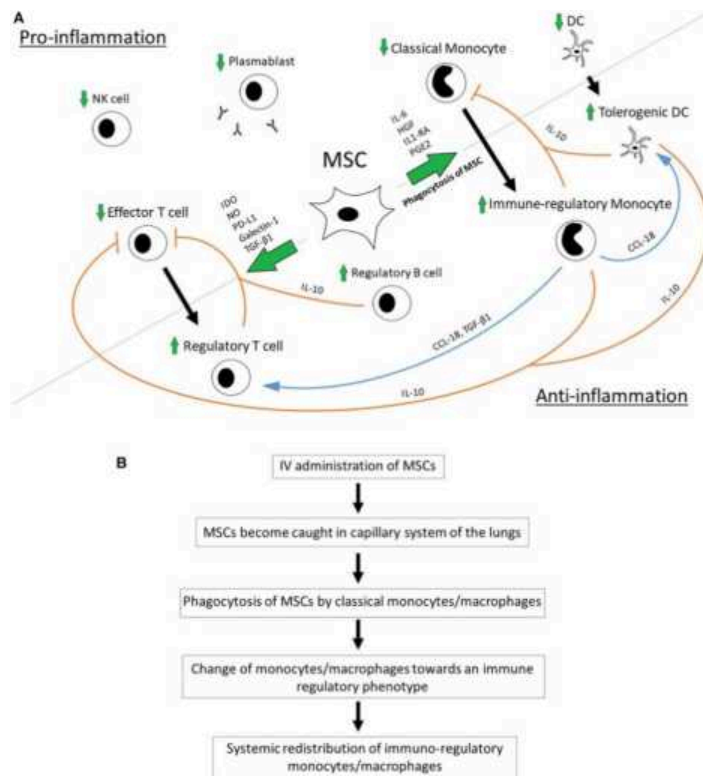
Penggunaan sel MSC sebagai tata laksana berbasis sel punca sangat besar. Selain sebagai modalitas untuk membawa agen eksternal spesifik menuju jaringan yang diinginkan, sel MSC sendiri merupakan sel aktif yang dapat mensekresikan banyak faktor yang tergabung dalam suatu kumpulan senyawa sekresi yang 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 antiinflamasi. Kemampuan antiinflamasi dari sel MSC berpotensi untuk digunakan sebagai terapi



rampu mencegah kerusakan jaringan dan menstimulasi pertumbuhan baru. Konsep sel MSC yang memiliki banyak jenis senyawa sekresi dan konsep *drug store*. Kemampuan ini memiliki banyak potensi medis unya dibidang cedera otak.^{17,68}

2.2.3 UC-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.⁶⁹ 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 3. Mekanisme UC-MSc sebagai imunomodulator¹⁷



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

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 dalam praktik klinis. Rute pemberian secara intranasal juga dapat dipertimbangkan 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.⁷⁰ 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 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 MSC sebanyak 3×10^6 sel tidak memberikan efek yang lebih baik secara bermakna.⁷¹ 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.⁷²





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

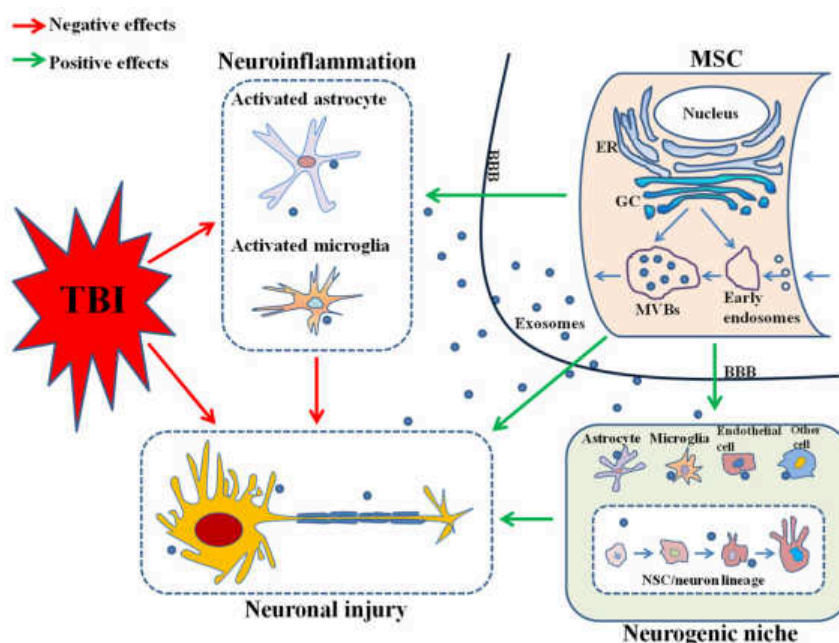
Terdapat beberapa mekanisme bagaimana pemberian UC-MSc pada otak yang mengalami COT dapat memiliki luaran klinis yang lebih baik (gambar 2.4). Pada kondisi normal, proses patofisiologi cedera otak sekunder pasca COT akan menyebabkan kerusakan BBB, infiltrasi sel-sel imun perifer, dan akan menyebabkan 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. 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 melibatkan sel UC-MSc itu sendiri.¹⁸ *Secretome* didefinisikan sebagai nanovesikel membran plasma endositik dengan ukuran berkisar antara 30 – 100 nm yang terbentuk dari sistem penyortiran vesikel oleh retikulum endoplasma sel. Vesikel ini dapat berisi berbagai macam n seperti lipid, protein, hingga kode genetik *messenger ribonucleic acid* dan *micro RNA* (miRNA).¹⁸ Komponen protein *secretome* diketahui 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*.^{73,74} 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.^{18,75}



Gambar 5. Efek secretome pada patofisiologi COT.¹⁸

Mekanisme bagaimana *secretome* dapat mengurangi efek negatif dari COT pada gambar 2.5. Efek utama *secretome* terhadap patofisiologi COT melalui modulasi neuroinflamasi, menstimulasi neurogenesis, dan esis. Selain itu, *secretome* juga diketahui dapat memperbaiki an 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 pascacedera di tikus dapat menghambat aktivasi sel astrosit GFAP+ dan mikroglia/makrofag CD68+ secara bermakna dibandingkan dengan kontrol yang digunakan yaitu *liposome*. Kedua sel tersebut adalah sel yang berperan dalam inisiasi dan progresi neuroinflamasi pada COT melalui sekresi sitokin proinflamasi.⁷⁶ 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*.⁷⁷ *Secretome* juga diketahui dapat mengurangi aktivasi makrofag yang dimodulasi salah satunya adalah melalui miRNA yang terkandung di dalamnya.⁷⁸ 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

a. 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)



mengeluarkan berbagai senyawa yang menghambat proses inflamasi neutrofil di berbagai tahapan (gambar 2.5A). Sel neutrofil diketahui an sel imun perifer yang paling banyak terdapat di lokasi cedera otak. Sel upun berperan positif dalam mencegah penyebaran cedera dan

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.⁴⁸ 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.⁸¹ 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.⁴⁸ Selain itu, PGE2 juga memiliki efek diferensiasi sel monosit klasik yang memiliki sifat proinflamasi menjadi monosit non-klasik yang memiliki sifat regulasi inflamasi.⁸² 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 memodulasi aktivitas monosit melalui perubahan fenotip monosit menuju sifat antiinflamasi. IL-6 diketahui dapat meningkatkan aktivitas antiinflamasi monosit melalui penekanan ekspresi CD14 sedangkan IL-10 meningkatkan konversi sel monosit menjadi fenotip CD206+ yang memiliki sifat antiinflamasi. TGF- β disisi lain memodulasi neuroinflamasi melalui penekanan aktivasi sel mikroglial.⁴⁸

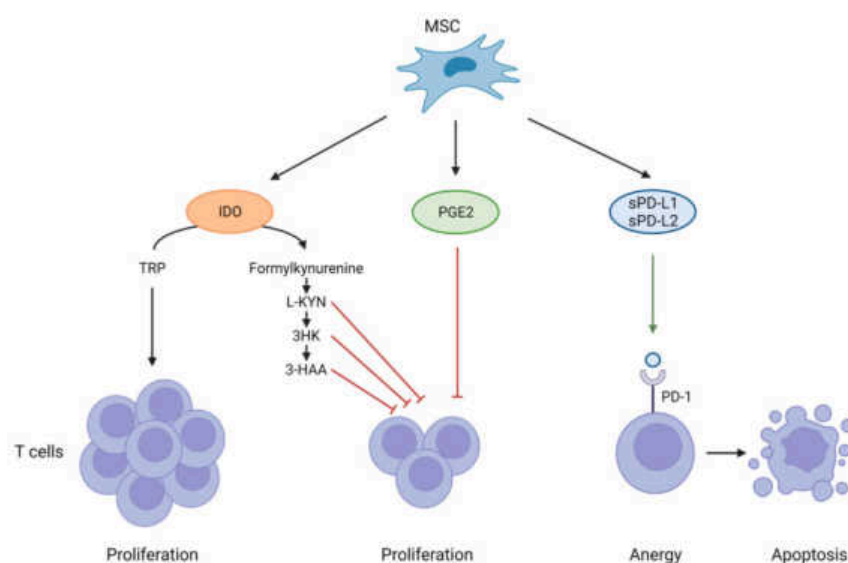
Selain pada sel imunitas bawaan, *secretome* MSC juga memiliki efek modulasi pada sistem imunitas adaptif. Cedera otak pada penderita COT akan menyebabkan kerusakan sel-sel saraf dan kerusakan BBB. Akibatnya, antigen spesifik pada sel SSP dapat tersebar keseluruh tubuh melalui sirkulasi sistemik dan 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



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 jalur kynurenine.⁴⁸

Asam amino triptofan (Trp) berperan penting dalam proses proliferasi sel T, degradasi triptofan di jaringan oleh enzimIDO dilaporkan dapat menghambat laju proliferasi sel T.(Lee 2020). Turunan katabolisme Trp seperti kynurenine (KYN), 3-hydroxykynurenine (3HK), dan 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA) juga dilaporkan dapat secara langsung menghambat proliferasi sel limfosit T.⁴⁸ Prostaglandin juga merupakan salah satu senyawa komponen *secretome* MSC yang dapat menghambat proliferasi sel limfosit T.⁴⁸ 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.⁸³ 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 mensekresikan 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.⁴⁸



Gambar 7. Efek secretome MSC pada sel imunitas adaptif.

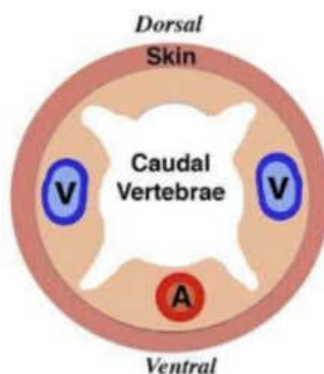


2.2.5 Dosis dan Cara Pemberian *Secretome*

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

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).⁸⁴



Gambar 8. Anatomi vena dan arteri ekor tikus.⁸⁴

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.⁷⁶ Penelitian serupa



ga juga berhasil menunjukkan efek positif injeksi *secretome* MSC pada sel pendarahan intraserebral. Pada penelitian ini, *secretome* diinjeksikan ke ekor tikus dengan dosis 0,5 µg/gram berat badan tikus. Sama seperti

penelitian lainnya, Ortega melihat efek injeksi *secretome* 24 jam setelah pemberian.⁸⁵

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 SSP. 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.⁸⁶

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).⁸⁷

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 5 hari berhasil memperbaiki fungsi kognitif tikus model diabetes yang diberikan perlakuan berupa induksi gangguan kognitif (*diabetes-induced cognitive impairment*).⁸⁸



PGD2 dan PGE2 juga ditemukan. Isoprostan dan prostanoïd berbeda dalam aspek stereokimianya. Sebagian besar rantai samping isoprostan berada dalam posisi cis terhadap cincin siklopentana, meskipun ada juga yang berada dalam posisi trans. Ada empat regioisomer yang mungkin dari isoprostan seri F, D dan E, setiap regio isomer akan menghasilkan delapan bentuk diastereoisomer, dalam hal ini terdapat 64 isomer berbeda yang dapat dibentuk dari satu seri isoprostan. Untuk membedakan dengan prostaglandin normal, maka dibuat singkatan "isoP", dengan awalan yang ditentukan oleh tempat ikatan gugus hidroksil pada rantai samping (5,8,12 atau 15) yang akan menunjukkan bentuk strukturnya (Nourooz, 2008).

F2-isoprostan digunakan sebagai biomarker peroksidasi lipid pada manusia ²³. Pertama kali, isoprostan ditemukan pada tahun 1967 oleh Nugteren, Vonkeman dan Vandrop, 20 tahun kemudian direalisasikan untuk kepentingan biologis. Pengukuran F2-IsoPs mempunyai beberapa keunggulan dibandingkan marker stres oksidatif lainnya, yaitu (1) stabil secara kimia, (2) merupakan produk spesifik peroksidasi, (3) dibentuk *in vivo*, (4) dapat diukur pada semua jaringan dan cairan biologis normal, sehingga dapat ditetapkan nilai normalnya, (5) kadarnya meningkat signifikan pada model hewan dengan kerusakan oksidatif, dan (6) tidak terpengaruh kandungan lipid pada diet. Sifat dari molekul F2-IsoPs lebih stabil, kuat, dan dapat dideteksi melalui berbagai cairan tubuh seperti urin, plasma, atau cairan serebrospinal ^{23,24,25}.

Radikal bebas yang terutama berasal dari oksigen molekuler telah terlibat dalam berbagai gangguan manusia termasuk aterosklerosis, kanker, penyakit neurodegeneratif, dan penuaan. Kerusakan pada biomolekul jaringan, termasuk lipid, protein, dan DNA, oleh radikal bebas dipostulasikan untuk berkontribusi penting bagi patofisiologi stres oksidatif. Lipid mudah diserang oleh radikal bebas, menghasilkan sejumlah produk peroksidasi. Isoprostanes (IsoPs) adalah serangkaian unik senyawa mirip prostaglandin yang dibentuk *in vivo* melalui peroksidasi asam arakidonat yang diprakarsai radikal bebas nonenzimatik, asam



lemak jenuh ganda (PUFA) secara radikal. Satu kelas IsoPs, F2-IsoPs, telah menjadi biomarker pilihan untuk menilai stres oksidatif endogen karena molekul ini stabil secara kimiawi dan memiliki telah terdeteksi di semua cairan biologis dan jaringan yang dianalisis. Selain F2-IsoPs, berbagai IsoPs

dengan struktur cincin yang berbeda telah diidentifikasi. Beberapa senyawa ini memiliki aktivitas biologis yang kuat yang dapat menjelaskan beberapa efek patofisiologis dari cedera oksidatif. Lebih lanjut, molekulmolekul mirip IsoP juga dihasilkan dari sejumlah PUFA yang berbeda termasuk asam R-linolenat, asam eikosapentaenoat (EPA), asam adrenat, dan asam docosahexaenoic (DHA).

F2-Isoprostan dapat diperiksa menggunakan beberapa metode. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) merupakan gold standart untuk pengukuran F2-isoprostan. Metode GC-MS memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi (90% dan 50%), namun mahal, memerlukan alat khusus dan memerlukan tenaga ahli untuk mengerjakannya sehingga metode lain yang dapat dijadikan sebagai metode pengukuran alternatif yaitu Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA). Metode ini lebih banyak digunakan dalam berbagai penelitian karena keakuratan hasil korelasinya yang sangat baik, sensitivitasnya 80%, relatif mudah digunakan dan biayanya yang lebih rendah. (Milne, 2005)

Penelitian pada dekade terakhir ini menyatakan bahwa senyawa F2- IsoPs akurat dalam mengukur peroksidasi lipid dan memiliki peran dalam mengukur kerusakan akibat oksidan pada penyakit seperti aterosklerosis, penyakit alzheimer dan paru-paru (Milne, 2005).

2.4 Pengaruh Pemberian UC-MSC Terhadap Kadar F2 Isoprostane

Pada COT terjadi proses neuroinflamasi, hal ini akan mengaktifkan astrosit dan mikroglia melalui *Toll-like receptors* (TLR). Aktivasi mikroglia akan mengaktifkan NF- κ B, aktivasi ini mengekspresikan *NADPH oxidase*. NADPH oxidase akan menghasilkan ROS dan mengekspresikan TNF- α . *Tumor necrosis factor- α* akan menginduksi cPLA2. Sedangkan aktivasi A1 astrosit akan menyebabkan peningkatan sitokin dan kemokin serta pelepasan glutamat. Pelepasan glutamat, akan menstimulasi keluarnya asam arakidonat (ARA) melalui *AA-selective Ca²⁺-dependent cytosolic phospholipase A2* (cPLA2). Asam arakidonat akan dioksidasi oleh COX, LOX, dan EPOX akan menghasilkan prostaglandin (PGs), leukotriene (LT), lipoxins (LX), dan tromboksan serta asam hidroksi eikosatrienoat (HETE), asam epoksi eikosatetraenoat dan dihidroksi eikosatrienoat (DHET) dan ROS. Selain itu, A1 astrosit



akan meningkatkan sitokin (IL-1 β , IL-6, and TNF- α) dan kemokin (CCL2 dan CXCL1), peningkatan ini akan menginduksi pembentukan ROS. Pembentukan ROS akan mengaktivasi NF- κ B dan mengoksidasi¹⁴.

Hal yang utama yang dibutuhkan dalam pembentukan F2-isoprostan adalah asam arakidonat, oksigen molekuler dan radikal bebas.²³ F2-isoprostan dihasilkan dari induksi radikal bebas terhadap asam arakidonat neuronal dari membran fosfolipid dan lipoprotein.¹⁹ Induksi radikal bebas terhadap ARA, akan membentuk *peroxyl*. *Peroxyl* akan membentuk *tetroxide* agar seimbang. *Tetroxide* yang mengalami reduksi O² akan membentuk *endoperoxide*, yang akan membentuk F2-isoprostan Spittle.^{22,23,24,25} F2-isoprostan akan berikatan dengan reseptor TX yang akan menyebabkan disfungsi endotel.²² Selain itu, F2-isoprostan yang berikatan dengan reseptor TX akan memediasi aktivitas platelet.¹⁴ Platelet yang teraktivasi akan mensintesis dan mengeluarkan IL-1 β , IL-6, and TNF- α (Chen dkk., 2020). Menurut Opere et al, F2-isoprostan dalam konsentrasi yang tinggi dapat melepaskan glutamat. Disfungsi endotel, peningkatan sitokin proinflamasi, dan pelepasan glutamat akan menyebabkan apoptosis. Tingginya sel yang mengalami apoptosis akan menyebabkan neurodegenerasi.^{14,24,25,26}

Semua faktor atau molekul *stem cell* yang disekresikan ke ruang ekstraseluler disebut sebagai *sekretome stem cell*.¹⁹ Sekretom NSC berisi sitokin seperti IL-10, IL-4 dan TGF- β .²⁰ Interleukin-10 dan TGF- β pada sekretom UC-MSC akan menginduksi polarisasi M1 makrofag menuju M2 makrofag, sedangkan IL-10 dan IL-4 akan menginduksi polarisasi M Φ makrofag menuju M2 makrofag, M2 makrofag akan berperan pada antiinflamasi.²⁷ M2 makrofag akan memproduksi IL-10 yang akan mengekspresikan A2 astrosit. A2 astrosit ini akan menghasilkan TGF- β yang akan mensupresi M1.²⁸ TGF- β juga berperan untuk menginduksi polarisasi A1 astrosit menjadi non-reaktif astrosit.²⁹

2.5 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 berukuran dan fisiologi yang lebih mendekati manusia, tikus dan hewan 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*.⁸⁹

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 tulang sehingga kurang menggambarkan kondisi COT derajat menengah dan 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.^{89,90}

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.⁹¹ Cedera otak melalui CCI ini dilaporkan terjadi secara difus yang mencakup cedera korteks, hipokampus, hingga degradasi talamus.⁹² 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.⁸⁹

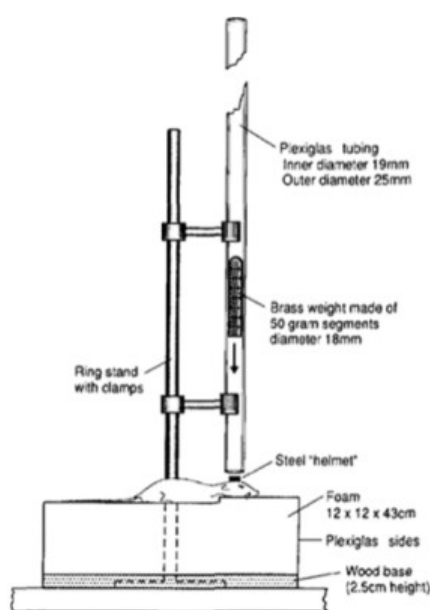
Beberapa model tikus diberikan cedera otak melalui ledakan (*blast injury*) untuk menirukan kondisi COT pada personil militer yang mengalami hantaman ledakan pada kepala tanpa mengalami cedera eksternal. Penelitian oleh Long telah mempelajari efek fisiologis, neuropatologi, dan perilaku kognitif pada tikus yang diberikan cedera ledakan.⁹³ Selain itu model tikus cedera ledakan juga sering digunakan untuk menilai efektivitas bahan pelindung seperti kevlar. DeWitt

an bahwa tikus yang dilindungi oleh kevlar pada regio toraks dan mengalami cedera aksonal difus yang lebih rendah.⁹⁴

emberian cedera dengan metode *weight drop–impact acceleration injury* 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.⁸⁹ Pada laporan penelitian orisinil oleh Marmarou pada tahun 1994, mereka melaporkan pemberian cedera pada tikus menggunakan alat khusus (gambar 2.17).



Gambar 11. Alat pemberi cedera otak oleh Marmarou.

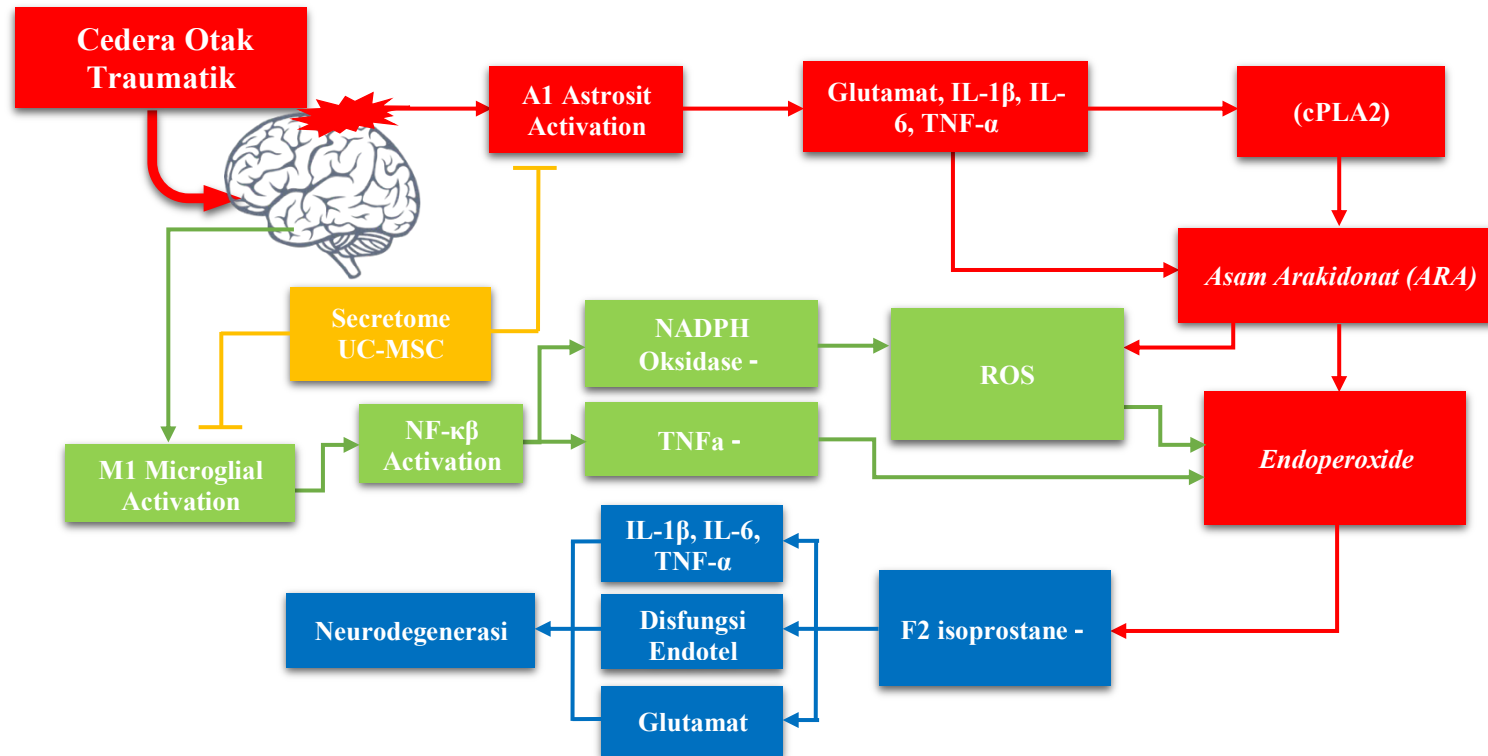
Pada alat ini, beban dapat diatur beratnya untuk memberikan gaya sebesar 50 hingga 500 gram. Melalui pipa kaca, beban akan jatuh bebas dari ketinggian 2 meter menuju tikus yang dipakaikan helm yang terbuat dari *stainless-steel* berdiameter 10 mm dengan tebal 3 mm. Helm ini terfiksasi pada bagian tengah 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*.⁹⁵ 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 otak. Keuntungan utama model *weight drop-impact acceleration injury* ini adalah prosesnya yang mudah untuk direplikasi dan cenderung memiliki beban penelitian yang lebih ringan.⁸⁹



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.⁹⁵ 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 berat badan 200-300 gram. Temuan histologi pada laporan ini menunjukkan adanya 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.⁹⁶ 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%.⁹⁷ 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 0,612.⁹⁸



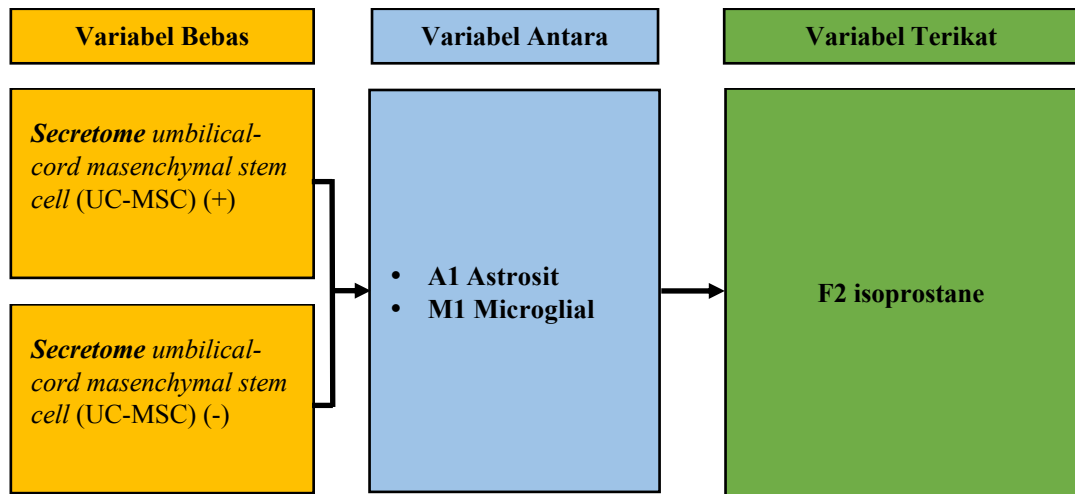
2.6 Kerangka Teori



Gambar 12. Kerangka Teori



2.7 Kerangka Konsep



Gambar 13. Kerangka Konsep

2.8 Hipotesis

1. Pemberian *secretome* UC-MSc berperan dalam menurunkan kadar F2 isoprostane pada serum hewan coba yang mengalami COT.
2. Pemberian *secretome* UC-MSc berperan dalam menurunkan skor NSS pada serum hewan coba yang mengalami COT.
3. Terdapat hubungan antara skor NSS dengan penurunan kadar F2 isoprostane pada serum hewan coba yang mengalami COT

2.9 Definisi Operasional

COT adalah perlukaan pada jaringan otak akibat trauma dari luar yang menyebabkan terjadinya defisit neurologis. Dalam penelitian ini, perlakuan hewan coba dengan dijatuhkan beban seberat 40 gram dari ketinggian 20 cm.

Secretome UC-MSc adalah nanovesikel ekstraseluler berukuran 30-150



nm diameter yang dihasilkan melalui proses eksositosis oleh MSC yang berasal dari tali *Wharton's Jelly*). *Secretome* ini berisi berbagai biomolekul, termasuk RNA, DNA, dan lipid, yang mencerminkan sifat sel induknya dan berfungsi sebagai

pembawa sinyal dalam komunikasi sel ke sel. Dalam penelitian ini digunakan sediaan secretome UC-MSC dosis tunggal 0,5 µg/gram berat badan melalui vena kaudal.

Isoprostan merupakan suatu kelompok senyawa mirip prostaglandin dan merupakan produk autooksidasi, terkandung dalam cairan biologis yang berasal dari hasil oksidasi nonenzimatik asam arakhidonat yang dikatalis oleh radikal bebas dan merupakan petanda untuk peroksidasi lipid dan stress oksidatif *in vivo*.

