



**Efek Injeksi Intratekal *Neural Stem Cell Secretome* Terhadap
Kadar Plasma F2-Isoprostan Pada Tikus Dengan
Spinal Cord Injury Sub-Akut Model Kontusio-Kompresi**

SKRIPSI

Oleh
Ahmad Shofiyul Labib
NIM 1820101010

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER

2022



**Efek Injeksi Intratekal *Neural Stem Cell Secretome* Terhadap
Kadar Plasma F2-Isoprostan Pada Tikus Dengan
Spinal Cord Injury Sub-Akut Model Kontusio-Kompresi**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

Ahmad Shofiyul Labib

NIM 182010101010

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS JEMBER

2022

PERSEMBAHAN

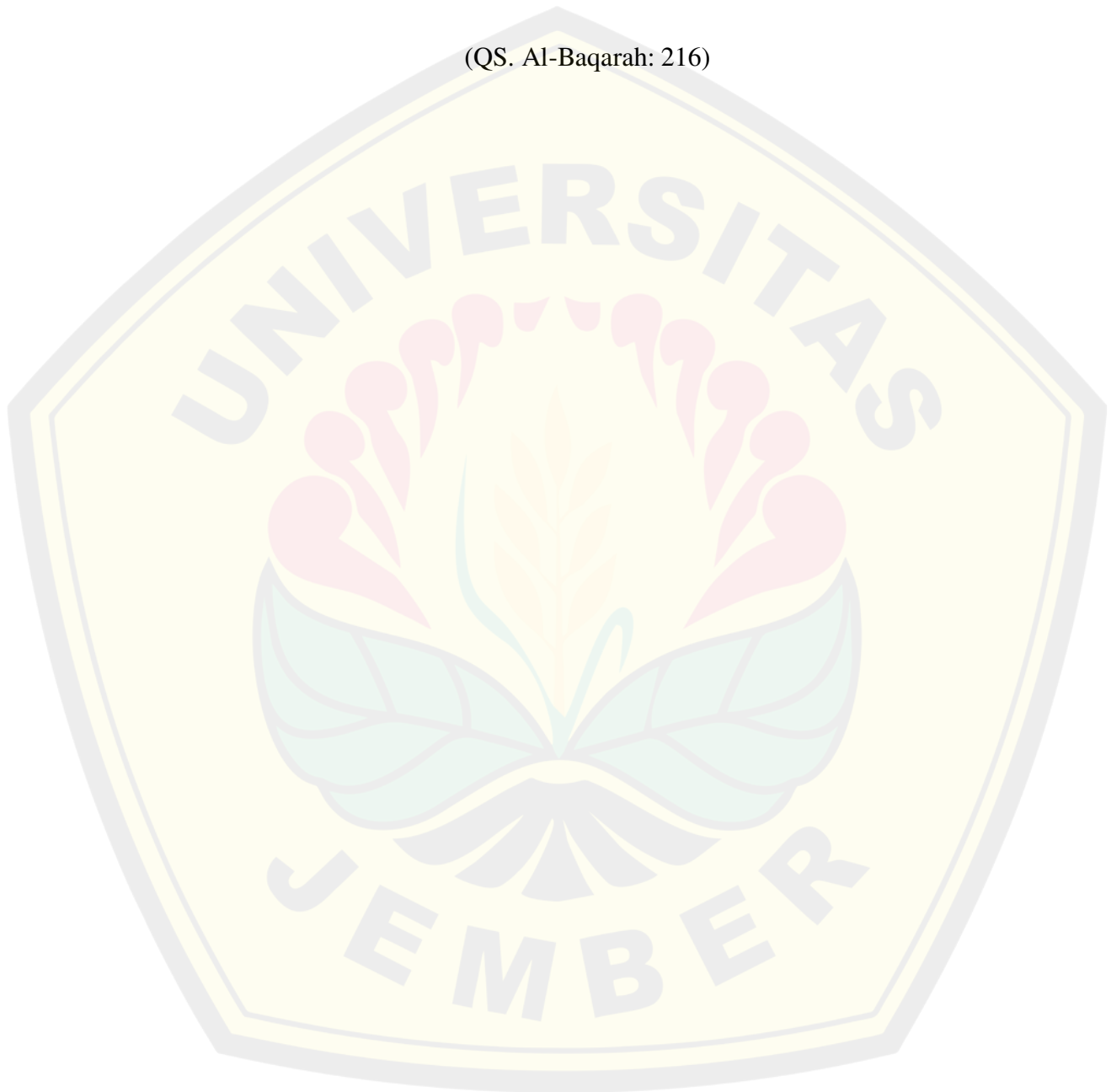
Dengan penuh rasa syukur, skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Kedua orangtua saya, Abi Moh. Chozin dan Umi Solichatun Nisak, yang mendidik dan membesarkan saya dengan penuh kasih sayang, dan selalu memberikan dukungan serta doa yang tiada henti;
2. Kakak, Jauharoh Maulidiyah, yang selalu memberikan semangat, bantuan dan doa kepada saya;
3. Seluruh guru saya semasa sekolah dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang senantiasa sabar dan penuh dedikasi dalam mendidik, membimbing dan memberikan ilmu kepada saya, sehingga saya bisa berada pada titik ini;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

“... Tetapi boleh jadi kamu tidak menyenangi sesuatu, padahal itu baik bagimu, dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu tidak baik bagimu. Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.”

(QS. Al-Baqarah: 216)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ahmad Shofiyul Labib

NIM : 182010101010

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efek Injeksi Intratekal *Neural Stem Cell Secretome* terhadap Kadar Plasma F2-Isoprostan pada Tikus dengan *Spinal Cord Injury* Sub-Akut Model Kontusio-Kompresi” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, karya ini belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 2022

Yang menyatakan,

Ahmad Shofiyul Labib

NIM 182010101010

SKRIPSI

**Efek Injeksi Intratekal Neural Stem Cell Secretome terhadap Kadar Plasma
F2-Isoprostan pada Tikus dengan Spinal Cord Injury Sub-Akut Model
Kontusio-Kompresi**

Oleh
Ahmad Shofiyul Labib
NIM 182010101010

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. dr. Sugiyanta, M.Ked.
Dosen Pembimbing Anggota : dr. I Nyoman Semita, Sp.OT (K) Spine

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Injeksi Intratekal *Neural Stem Cell Secretome* terhadap Kadar Plasma F2-Isoprostan pada Tikus dengan *Spinal Cord Injury* Sub-Akut Model Kontusio-Kompresi” karya Ahmad Shofiyul Labib telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

dr. Heni Fatmawati, M.Kes., Sp.Rad. (K)
NIP. 197602122005012001

dr. Laksmi Indreswari Sp.B.
NIP. 198309012008012012

Anggota II,

Anggota III,

Dr. dr. Sugiyanta, M.Ked.
NIP. 197902072005011001

dr. I Nyoman Semita, Sp.OT. (K) Spine
NIP. 196306191989011002

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr.Supangat, M.Kes, Ph.D, Sp.BA
NIP 197304241999031002

RINGKASAN

Efek Injeksi Intratekal *Neural Stem Cell Secretome* terhadap Kadar Plasma F2-Isoprostan pada Tikus dengan *Spinal Cord Injury* Sub-Akut Model Kontusio-Kompresi; Ahmad Shofiyul Labib, 182010101010; 2022; 77 halaman; Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Spinal cord injury (SCI) terjadi 700.000 kejadian setiap tahunnya. Kejadian SCI paling sering terjadi pada pria usia produktif. Angka insidensi SCI di Indonesia pada tahun 2016 adalah 16.383 dan angka prevalensi SCI adalah 52.5421. Angka mortalitas SCI di negara berkembang sangat tinggi, seperti di Zimbabwe dapat mencapai 49% per tahun. Morbiditas paling banyak pada SCI adalah infeksi saluran kemih, *pressure sores*, multimorbiditas psikologi, dan multimorbiditas penyakit kronik. Patofisiologi SCI didasari oleh beberapa kaskade destruktif, antara lain adalah iskemia, stres oksidatif, inflamasi, apoptosis, dan disfungsi alat gerak. *Spinal cord injury* terdapat 2 fase yaitu *primary* dan *secondary injury*. Pada *secondary injury* terdapat 3 fase yaitu akut, sub-akut dan kronik. Perawatan medis dan bedah dapat mengurangi angka mortalitas pada SCI, tetapi pemulihan fungsional pada jangka panjang tetap terbatas. Oleh karena itu, dibutuhkan terapi yang bersifat neuroprotektif dan neurodegeneratif untuk SCI berupa terapi berbasis sel yaitu *Neural Stem Cell* (NSC). *Stem cell* mengeluarkan protein terlarut dan vesikel ekstraseluler yang dinamakan sekretom. *Neural stem cell* dapat mereduksi proinflamasi dan menginduksi upregulasi dari antiinflamasi dan antiapoptosis. Peningkatan antiinflamasi dan antiapoptosis oleh sekretom NSC mampu menurunkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) menuju kondisi fisiologis. Penurunan ROS dapat dilihat dengan pemeriksaan F2-isoprostan. Pemakaian sekretom dapat digunakan sebagai alternatif pertimbangan keamanan pada stem cell, seperti pertimbangan *tumorigenicity*, *immune compatibility*, pembentukan emboli, serta transmisi infeksi. Tujuan dari penelitian adalah mengetahui efek injeksi intratekal sekretom pada tikus dengan SCI terhadap kadar plasma F2-isoprostan.

Penelitian ini adalah *true experimental* yang bersifat kuantitatif dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), menggunakan pendekatan *post test only-control group*. Hewan coba yang digunakan adalah 15 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Sprague dawley*. 15 ekor tikus dibagi menjadi 3 kelompok yaitu: kelompok normal, kelompok SCI dengan injeksi intratekal sekretom, dan kelompok SCI tanpa injeksi intratekal sekretom. Model SCI dibuat menggunakan *Yasargil clip* (beban 65 g, panjang 7 mm dengan gaya tekan 150 kDyne) yang akan membentuk model kompresi-kontusio. Setelah 3 hari, akan dilakukan injeksi sekretom NSC dengan dosis 30 µl secara intratekal pada kelompok yang mendapatkan injeksi. Setelah observasi dan perawatan 28 hari, akan dilakukan terminasi dengan induksi anestesi inhalasi eter dan pemeriksaan F2-isoprostan

menggunakan ELISA Kit 8-epi-PGF2 α (8-Epi-Prostaglandin F2 Alpha) dari Elabscience[®].

Hasil yang didapatkan dalam penelitian ini adalah injeksi intratekal sekretom NSC dapat menurunkan kadar plasma F2-isoprostan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Sprague dawley* dengan SCI sub-akut model kontusio-kompresi. Hal ini dapat dilihat dari perbandingan kelompok SCI yang diinjeksi intratekal sekretom NSC dan kelompok SCI yang tidak diinjeksi sekretom NSC yang menunjukkan perbedaan yang nyata (sig. 0,02). Selain perbandingan tersebut, perbandingan kelompok normal dan kelompok SCI yang diinjeksi intratekal sekretom NSC tidak menunjukkan perbedaan (sig. 0,993). Sehingga dapat disimpulkan bahwa efek injeksi intratekal sekretom NSC dapat menurunkan kadar plasma F2-isoprostan pada tikus dengan SCI sub-akut model kontusio-kompresi.



PRAKATA

Puji syukur kepada Allah subhanahu wa ta'ala atas karunia dan nikmat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan segala hormat dan kerendahan hati, penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Kedua orangtua saya, Abi Moh. Chozin dan Umi Solichatun Nisak, yang mendidik dan membesarkan saya dengan penuh kasih sayang, dan selalu memberikan dukungan serta doa yang tiada henti;
2. Kakak, Jauharoh Maulidiyah, yang selalu memberikan semangat, bantuan dan doa kepada saya;
3. Dr. dr. Sugiyanta, M.Ked. selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. I Nyoman Semita, Sp.OT (K) Spine selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah bersedia meluangkan pikiran, waktu, dan tenaga untuk membimbing saya selama proses pengerjaan skripsi ini;
4. dr. Heni Fatmawati, M.Kes., Sp.Rad. selaku Dosen Penguji Utama dan dr. Laksmi Indreswari Sp.B. selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan tanggapan dan saran dalam proses penyusunan skripsi ini;
5. dr. Ayu Munawaroh Aziz M. Biomed. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing serta mengarahkan saya selama berada di Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
6. drh. Muhammad Jundi Mubarak dan drh. Devi Nur Islami selaku dokter poliklinik hewan Dinas Ketahanan Pangan dan Peternakan Kabupaten Jember, Bu Nurul Istinaroh, A.Md. selaku Pranata Laboratorium Pendidikan (PLP) Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan Pak Agus Murdojohadi Putradjaka, A.Md selaku PLP Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, yang telah membimbing dan membantu saya selama melakukan penelitian dalam skripsi ini;
7. Sahabat terbaik sejak SMA, Syarif, Poppy, Fara dan Fira (HAJA) yang telah berbagi suka dan duka dan telah banyak membantu;

8. Kelompok belajar, Ilham, Edo, dan Clau (FD), serta Wahyu, Lala, Ineza, Izza, Zadia, Tata, dan Anis (UKM Rebahan) dan Yashinta yang menemani belajar dan membantu di Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
9. Teman seperjuangan dalam penelitian ini, Sonya Dinda Fatma Dewi, Rihhadatul Aisy, Linda Ayu Kusuma Wardani, dan Ibrila Asfarina Ahmadah yang telah bersedia berjuang bersama, saling membantu, memberikan dukungan, dan semangat dalam menyelesaikan penelitian dan menyusun skripsi ini;
10. Teman sejawat saya, Angkatan 2018 (Cranium) Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
11. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
12. Semua pihak yang telah membantu dalam pengerjaan skripsi ini yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Penulis akan menerima segala tanggapan dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga yang tertuang dalam skripsi ini dapat bermanfaat bagi dunia penelitian khususnya di bidang kedokteran serta kehidupan manusia secara keseluruhan.

Jember, Juni 2022

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|--|------|
| HALAMAN SAMBUNG..... | i |
| HALAMAN JUDUL..... | ii |
| HALAMAN PERSEMBAHAN..... | iii |
| HALAMAN MOTO..... | iv |
| HALAMAN PERNYATAAN..... | v |
| HALAMAN PEMBIMBING..... | vi |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | vii |
| RINGKASAN..... | viii |
| PRAKATA..... | x |
| DAFTAR ISI..... | xii |
| DAFTAR GAMBAR..... | xiv |
| DAFTAR TABEL..... | xv |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xvi |
| DAFTAR SINGKATAN..... | xvii |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 3 |
| 1.4.1 Manfaat Teoritis..... | 3 |
| 1.4.2 Manfaat Praktis..... | 3 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 2.1 Spinal Cord | 4 |
| 2.1.1 Anatomi <i>Spinal Cord</i> Manusia..... | 4 |
| 2.1.2 Fisiologi <i>Spinal Cord</i> Manusia..... | 5 |
| 2.1.3 Anatomi <i>Spinal Cord</i> Tikus..... | 6 |
| 2.2 Spinal Cord Injury | 8 |
| 2.2.1 Patofisiologi <i>Spinal Cord Injury</i> | 10 |
| 2.2.1.1 Cedera primer..... | 10 |
| 2.2.1.2 Cedera sekunder..... | 11 |
| 2.3 F2-Isoprostan | 13 |
| 2.3.1 Definisi..... | 13 |
| 2.3.2 Pengukuran F2-Isoprostan..... | 16 |
| 2.4 Stem Cell | 16 |
| 2.5 Sekretom Stem Cell | 18 |
| 2.6 Kerangka Teori | 20 |
| 2.7 Kerangka Konseptual dan Hipotesis Penelitian | 22 |
| BAB 3. METODE PENELITIAN | 24 |
| 3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian | 24 |
| 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian | 25 |
| 3.3 Karakteristik Hewan Coba dan Jumlah Replikasi | 25 |
| 3.3.1 Karakteristik Hewan Coba..... | 25 |

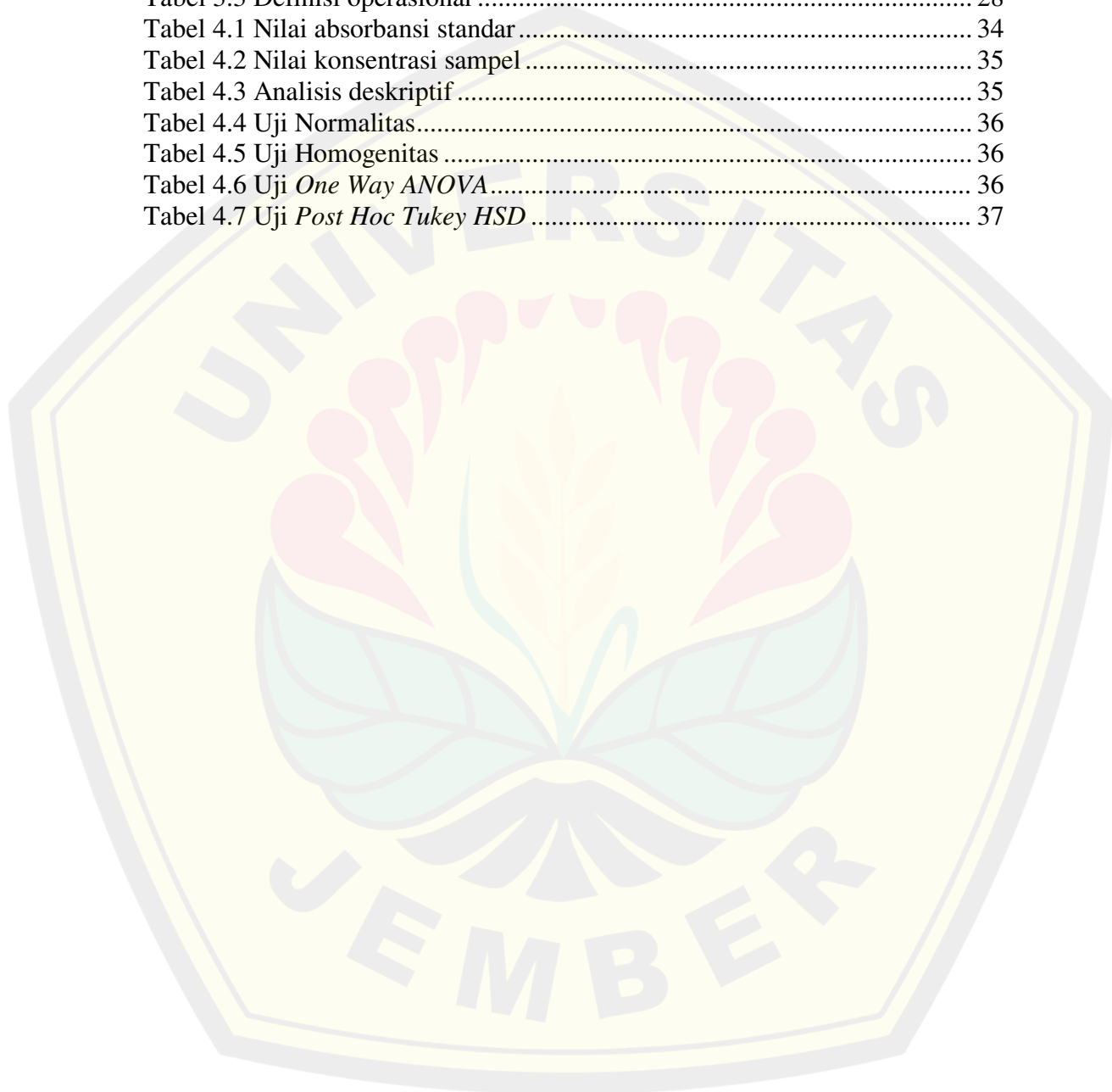
| | |
|--|-----------|
| 3.3.2 Jumlah Replikasi..... | 26 |
| 3.4 Jenis dan Sumber Data | 27 |
| 3.5 Variabel Penelitian | 27 |
| 3.6 Definisi Operasional dan Skala Pengukuran | 28 |
| 3.7 Instrumen Penelitian | 28 |
| 3.7.1 Alat penelitian..... | 28 |
| 3.7.2 Bahan penelitian | 29 |
| 3.8 Prosedur Penelitian | 30 |
| 3.9 Teknik Penyajian dan Analisis data | 32 |
| 3.10 Alur Penelitian | 34 |
| BAB 4. METODE PENELITIAN | 35 |
| 4.1 Hasil Penelitian | 35 |
| 4.2 Pembahasan | 38 |
| BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN | 42 |
| 5.1 Kesimpulan..... | 42 |
| 5.2 Saran | 42 |
| DAFTAR PUSTAKA | 43 |
| LAMPIRAN..... | 51 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|---|----|
| Gambar 2.1 Kanalis sentralis, <i>gray matter</i> , dan <i>white matter</i> | 4 |
| Gambar 2.2 Ukuran dan letak <i>ascending</i> dan <i>descending tract</i> pada tikus dan manusia | 7 |
| Gambar 2.3 Ilustrasi SCI primer | 10 |
| Gambar 2.4 Ilustrasi dan skema alur pada SCI sekunder..... | 11 |
| Gambar 2.5 Skema alur pada SCI primer dan sekunder | 12 |
| Gambar 2.6 Skema pembentukan F2-isoprostan | 14 |
| Gambar 2.7 Skema pembentukan <i>endoperoxide</i> | 15 |
| Gambar 2.8 Sekretom..... | 18 |
| Gambar 2.9 Skema kerangka teori | 20 |
| Gambar 2.10 Skema kerangka konsep | 22 |
| Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian..... | 24 |
| Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian..... | 33 |
| Gambar 4.1 Kurva hubungan antara absorbansi dan konsentrasi larutan standar F2-isoprostan | 34 |

DAFTAR TABEL

| | |
|---|----|
| Tabel 3.1 Rincian tempat penelitian..... | 25 |
| Tabel 3.2 Rincian waktu penelitian..... | 25 |
| Tabel 3.2 Variabel penelitian | 27 |
| Tabel 3.3 Definisi operasional | 28 |
| Tabel 4.1 Nilai absorbansi standar | 34 |
| Tabel 4.2 Nilai konsentrasi sampel | 35 |
| Tabel 4.3 Analisis deskriptif | 35 |
| Tabel 4.4 Uji Normalitas..... | 36 |
| Tabel 4.5 Uji Homogenitas | 36 |
| Tabel 4.6 Uji <i>One Way ANOVA</i> | 36 |
| Tabel 4.7 Uji <i>Post Hoc Tukey HSD</i> | 37 |



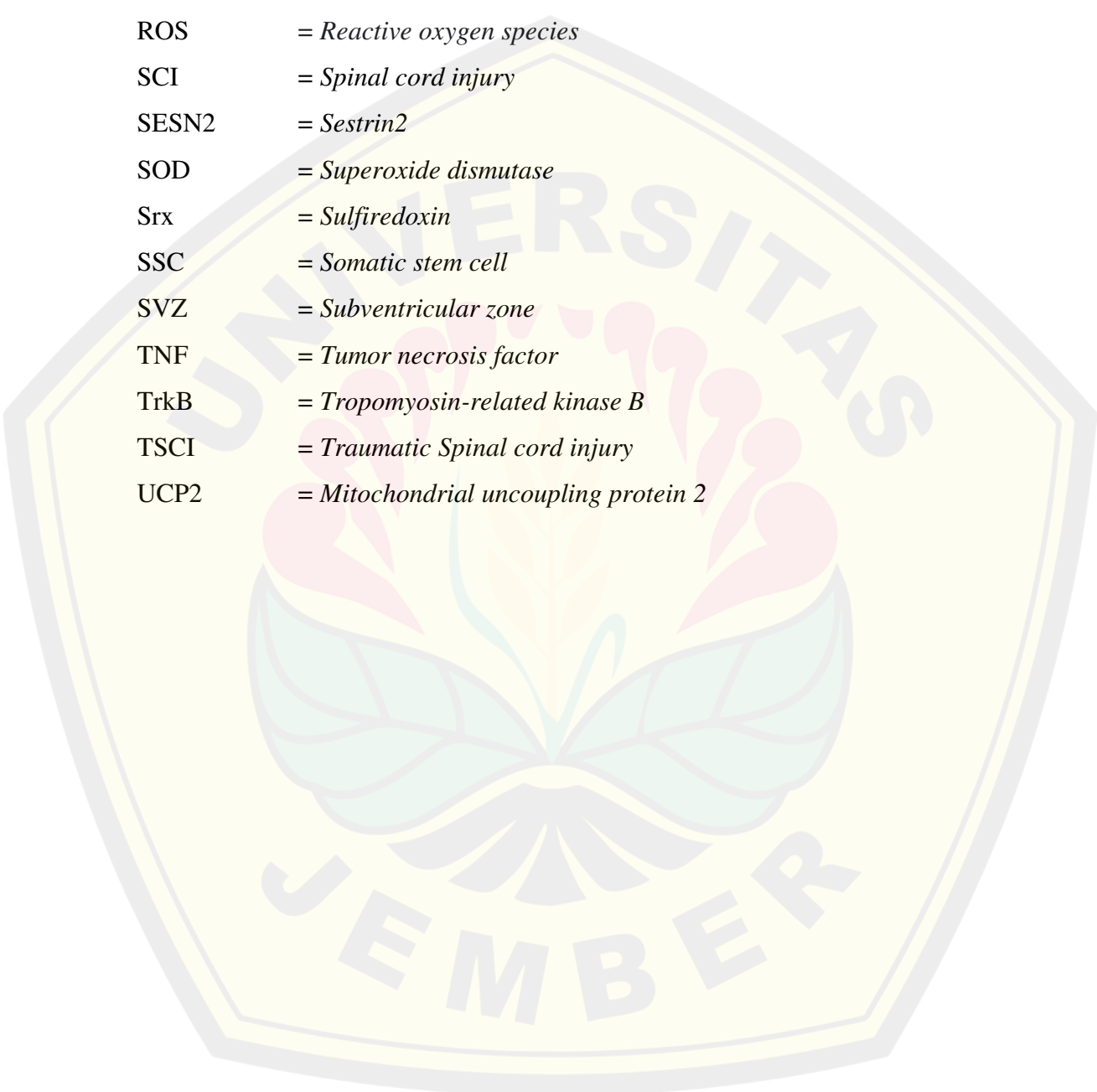
DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|--|----|
| Lampiran 1. SOP Operasi | 49 |
| Lampiran 2. SOP Injeksi Intratekal Sekretom | 50 |
| Lampiran 3. Lokomotor Skor Basso, Beattie, dan Bresnahan (BBB) | 51 |
| Lampiran 4. Perawatan Post Operasi | 53 |
| Lampiran 5. SOP Pemeriksaan F2-isoprostan Menggunakan ELISA | 54 |
| Lampiran 6. Surat Etik Penelitian | 57 |
| Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian | 58 |



DAFTAR SINGKATAN

| | |
|----------|--|
| Akt | = <i>Protein kinase B</i> |
| AMPA | = Asam -amino-3-hidroksi-5-methyl-4-isoxazole propionate |
| ARA | = <i>Arachidonic acid</i> |
| ASC | = <i>Adult stem cell</i> |
| BAD | = <i>Bcl-2-associated death promoter</i> |
| BBB | = Basso, Beattie, dan Bresnahan |
| BCL-2 | = <i>B cell lymphoma-2</i> |
| BDNF | = <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> |
| BSCB | = <i>Blood spinal cord barrier</i> |
| CM | = <i>Conditioned media</i> |
| CNF | = <i>Ciliary neurotrophic factor</i> |
| COX | = Siklooksigenase |
| cPLA2 | = <i>Cytosolic phospholipase A2</i> |
| EGF | = <i>Epidermal growth factor</i> |
| ELISA | = <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| ESC | = <i>Embryonic Stem cell</i> |
| F2-isoPs | = <i>F2-isoprostane</i> |
| GSH-Px | = <i>Glutathione peroxidase</i> |
| GSSG-R | = <i>Glutathione reductase</i> |
| HSC | = <i>Hematopoietic stem cell</i> |
| IGF | = <i>Insulin-like growth factor</i> |
| IL | = Interleukin |
| iPSCs | = <i>Induced pluripotent stem cells</i> |
| mPTPs | = <i>Mitochondrial permeability transition pores</i> |
| MRI | = <i>Magnetic resonance imaging</i> |
| MSC | = <i>Mesenchymal stem cell</i> |
| NGF | = <i>Nerve growth factor</i> |
| NMDA | = N-metil-D-aspartat |



| | |
|-------|---|
| NSC | = <i>Neural Stem Cell</i> |
| NTSCI | = <i>Non-Traumatic Spinal cord injury</i> |
| pCREB | = <i>Phosphorylated cAMP response element</i> |
| PI3K | = <i>Phosphatidy- inositol-3-kinase</i> |
| PSC | = <i>Pluripotent stem cell</i> |
| ROS | = <i>Reactive oxygen species</i> |
| SCI | = <i>Spinal cord injury</i> |
| SESN2 | = <i>Sestrin2</i> |
| SOD | = <i>Superoxide dismutase</i> |
| Srx | = <i>Sulfiredoxin</i> |
| SSC | = <i>Somatic stem cell</i> |
| SVZ | = <i>Subventricular zone</i> |
| TNF | = <i>Tumor necrosis factor</i> |
| TrkB | = <i>Tropomyosin-related kinase B</i> |
| TSCI | = <i>Traumatic Spinal cord injury</i> |
| UCP2 | = <i>Mitochondrial uncoupling protein 2</i> |

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Spinal cord injury (SCI) adalah kerusakan pada *spinal cord* yang bisa disebabkan karena trauma dan non-trauma (World Health Organization dan ISCS, 2013). Kejadian terbanyak pada SCI disebabkan oleh trauma. Angka kejadian SCI di dunia adalah 700.000 kasus baru per tahun (Zivkovic dkk., 2021). Kejadian SCI di Amerika Serikat umumnya terjadi pada usia 19 tahun dan 80,3% kejadian ini terjadi pada pria (National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2020). Beban ekonomi tahunan pada penderita SCI dapat mencapai 2,67 miliar dolar di Kanada (Anjum dkk., 2020). Di Indonesia pada tahun 2016, angka Insidensi SCI adalah 16.383 dan angka prevalensi SCI adalah 52.5421 (James dkk., 2019). Angka mortalitas pada *Traumatic Spinal Cord Injury* di negara maju lebih rendah dibandingkan negara berkembang, Seperti angka mortalitas dalam 1 tahun di Zimbabwe dapat mencapai 49% (Cripps dkk., 2011). Angka morbiditas paling banyak pada SCI adalah infeksi saluran kemih (37,1%), *pressure sores* (26,6%), multimorbiditas psikologi (37,4%), dan multimorbiditas penyakit kronik (51,1%) (Tchvaloon dkk., 2008; Peterson dkk., 2020).

Spinal cord injury merupakan keadaan patologi dengan destruksi saraf yang menjadikan disfungsi motorik, sensorik, dan otonom. Patofisiologi SCI didasari oleh beberapa kaskade destruktif, antara lain adalah iskemia, stres oksidatif, inflamasi, apoptosis, dan disfungsi alat gerak. *Spinal cord injury* terdapat 2 fase yaitu *primary* dan *secondary injury*. Pada *secondary injury* terdapat 3 fase yaitu akut, sub-akut dan kronik (Anjum dkk., 2020).

Penangan SCI pada saat ini adalah operasi dekompresi-stabilisasi, kontrol hemodinamik, kortikosteroid (*methylprednisolone sodium succinate*), profilaksis antikoagulasi, dan rehabilitasi medis (Fehlings dkk., 2017; Galeiras Vázquez dkk., 2017; Mourelo Fariña dkk., 2017). Perawatan medis dan bedah dapat mengurangi angka mortalitas, tetapi pemulihan fungsional pada jangka

panjang tetap terbatas. Oleh karena itu, dibutuhkan terapi yang bersifat neuroprotektif dan neurodegeneratif untuk SCI berupa terapi berbasis sel yaitu *neural stem cell* (Ahuja dkk., 2020).

Stem cell mengeluarkan protein terlarut (sitokin, kemokin, faktor pertumbuhan dan protease) dan vesikel ekstraseluler (*exosomes*, *ectosomes*, dan *microvesicles*) yang dinamakan dengan sekretom (Driscoll dan Patel, 2019; Kalluri dan LeBleu, 2020). Sekretom berfungsi untuk komunikasi antar sel dengan cara parakrin. Faktor-faktor ini adalah kunci dari regulasi proses-proses fisiologi seperti mendorong sel-sel endogen dan sel progenitor ke tempat cedera serta dapat memediasi apoptosis, proliferasi, migrasi, dan angiogenesis (Xia dkk., 2019). *Neural stem cell* dapat mereduksi proinflamasi pada SCI dengan penekanan ekspresi Bax, caspase-3, Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β , and IL-6 secara signifikan, dan terjadi upregulasi dari antiinflamasi dan antiapoptosis (Rong dkk., 2019). Peningkatan antiinflamasi dan antiapoptosis oleh sekretom NSC mampu menurunkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) menuju kondisi fisiologis (Dos Santos dkk., 2021). Penurunan ROS dapat dilihat dengan pemeriksaan F2-isoprostan, dikarenakan pemeriksaan ini bersifat spesifik, sensitif, dan stabil dibandingkan penanda stres oksidatif lainnya (Konermann, 2019).

Pemakaian sekretom dapat digunakan sebagai alternatif pertimbangan keamanan pada stem cell, seperti pertimbangan *tumorigenicity*, *immune compatibility*, pembentukan emboli, serta transmisi infeksi (Vizoso dkk., 2017). Selain itu, keuntungan pemakaian sekretom dibandingkan *stem cell* adalah biaya produksi lebih murah, penyimpanan sekretom lebih mudah, dan komponen terapeutik dari sekretom dapat disesuaikan dengan kebutuhan (Foo dkk., 2021).

Berdasarkan permasalahan diatas, maka peneliti ingin meneliti mengenai “Efek Injeksi Intratekal *Neural Stem Cell Secretome* terhadap Kadar F2-Isoprostan pada Tikus dengan *Spinal Cord Injury* Sub-Akut Model Kontusio-Kompresi”.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan identifikasi masalah di atas maka dapat dibuat rumusan masalah yaitu, bagaimana efek injeksi intratekal sekretom pada tikus dengan SCI terhadap kadar plasma F2-isoprostan?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasar pada rumusan masalah yang dibuat, maka tujuan dari penelitian adalah mengetahui efek injeksi intratekal sekretom pada tikus dengan SCI terhadap kadar plasma F2-isoprostan.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Manfaat teoritis pada penelitian ini adalah memberikan wawasan kepada penulis dan akademisi mengenai efek injeksi intratekal sekretom pada tikus dengan SCI terhadap kadar plasma F2-isoprostan.

1.4.2 Manfaat Praktis

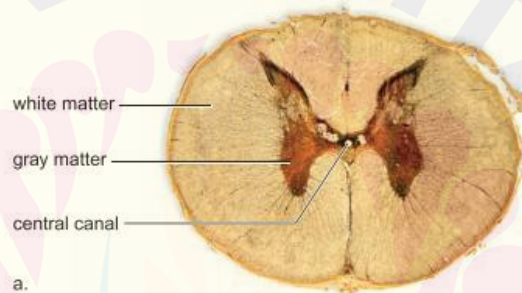
Manfaat praktis pada penelitian ini yaitu sebagai kepustakaan dan landasan penelitian selanjutnya mengenai efek injeksi intratekal sekretom pada tikus dengan SCI terhadap kadar plasma F2-isoprostan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Spinal Cord*

2.1.1 Anatomi *Spinal Cord* Manusia

Spinal cord adalah organ saraf pusat yang berawal dari batang otak dan memiliki bentuk silinder panjang langsing. Organ ini terdapat dalam *vertebrae*. *Spinal cord* memanjang dari dasar otak melalui foramen magnun dan berjalan ke inferior pada kanalis vertebralis. *Spinal cord* memiliki diameter garis tengah 0,8 inci dan memiliki panjang 18 inci (Mader dan Windelspecht, 2012; Sherwood, 2013).



Gambar 2.1 Kanalis sentralis, *gray matter*, dan *white matter* (Sumber: Mader dan Windelspecht, 2012).

Spinal cord memiliki 3 lapisan pembungkus: (1) duramater; (2) *arachnoid* mater; dan (3) pia mater (Splittgerber, 2019). *Spinal cord* yang dipotong secara melintang didapatkan gambaran kanalis sentralis, *gray matter*, dan *white matter*. Kanalis sentralis berisi cairan serebrospinal. Lalu *gray matter* terletak ditengah *Spinal cord* dan berbentuk seperti huruf H. Sedangkan *white matter* berada di sekitar *gray matter* (Mader dan Windelspecht, 2012).

Sepanjang *spinal cord* terdapat 31 pasang saraf spinal. Saraf spinalis melekat dengan *spinal cord* dilekatkan oleh radiks anterior atau motorik dan radiks posterior atau sensorik (Splittgerber, 2019). Saraf spinalis diberikan nama sesuai dengan bagian kolumna vertebralis tempatnya keluar. Terdapat 8 pasang saraf servikalis (C1-C8), 12 pasang saraf thorakalis (T1-T12), 5 pasang saraf lumbalis (L1-L5), 5 pasang saraf sakralis (S1-S5), dan 1 pasang saraf

koksigeal (Co1) (Sherwood, 2013). *Spinal cord* memanjang dari C1, persimpangan *medulla*, dan sampai dengan L1. Setelah L1 akan berubah menjadi *conus medullaris* (Hall dan Hall, 2020). Setelah *conus medullaris* akan menjadi struktur yang menyebar seperti ekor kuda yang disebut *cauda equina* dan berakhir dengan perpanjangan jaringan fibrosa yang disebut *filum terminale* (Hartline, 2021). Suplai darah pada *Spinal cord* berasal dari pleksus pada *medulla posterior* dan arteri spinalis anterior. Pembuluh darah tersebut mendapatkan suplai darah oleh beberapa cabang dari pembuluh darah lumbal dan interkostal, termasuk arteri Adamkiewicz dan arteri vertebralis (Kumar Praveen J dan Clark Michael L, 2020).

2.1.2 Fisiologi *Spinal Cord* Manusia

Sistem saraf pusat terdiri dari *spinal cord* dan otak (Sherwood, 2013). Sistem saraf pusat memiliki tiga tingkat utama yang memiliki keunikan fungsional yang spesifik: (1) setinggi *spinal cord*; (2) setinggi subkortikal atau otak bagian bawah; dan (3) setinggi kortikal atau otak bagian atas (Hall dan Hall, 2020). *Spinal cord* yang dipotong secara melintang didapatkan gambaran kanalis sentralis, *gray matter*, dan *white matter*. Kanalis sentralis berisi cairan serebrospinal yang berfungsi untuk menjaga *spinal cord* (Sherwood, 2013).

White matter terbentuk dari akson yang bermielin. Sedangkan *gray matter* terbentuk dari neuron, *glial cell bodies*, dan *interneuron*. *Interneuron* berfungsi untuk menghubungkan dua neuron terletak pada bagian tubuh yang berbeda. *Gray matter* dibagi menjadi beberapa bagian yg disebut dengan *horn*, yaitu: *posterior gray horn*, *anterior gray horn*, dan *lateral gray horn*. *Posterior gray horn* berfungsi untuk pemrosesan sinyal sensorik. *Anterior gray horn* berfungsi untuk mengirimkan sinyal motorik ke otot rangka. Sedangkan *lateral gray horn* yang hanya ditemukan di daerah *thorax*, lumbal bagian atas, dan sakral memiliki tugas dalam komponen sentral dari divisi simpatik sistem saraf otonom. *White matter* dibagi menjadi beberapa *column*, yaitu *posterior column*, *anterior column*, dan *lateral column*. *Posterior column* terdiri dari akson

traktus asenden. *Sedangkan anterior column dan lateral column* terdiri dari akson traktus asenden dan desenden. Traktus asenden membawa informasi sensorik ke otak, sedangkan traktus desenden membawa perintah motorik dari otak (Hartline, 2021).

Spinal cord berfungsi sebagai sarana komunikasi antara otak dan saraf perifer yang meninggalkan *spinal cord*. Ketika ada impuls, reseptor sensorik akan akan menghasilkan sinyal saraf yang akan melewati serat sensorik dan akan diteruskan ke *spinal cord* melalui traktus asenden dan akan naik setinggi subkortikal dan kortikal. Rasa sakit memiliki “The gate control theory”, teori ini menyebutkan bahwa saluran pada *spinal cord* memiliki *gate* atau gerbang. Gerbang ini berfungsi untuk mengontrol aliran pesan nyeri dari saraf perifer ke otak, pesan rasa sakit ini dapat dicegah mencapai otak dan ada juga pesan rasa sakit yang dibiarkan lewat langsung menuju otak. Endorfin dapat memblokir sementara pesan rasa sakit dan pesan lain yang diterima oleh reseptor sentuhan. Untuk memberikan respon, otak memulai memberikan kontrol volunter sehingga sinyal motorik yang berasal dari otak akan melewati traktus desenden ke *spinal cord* dan selanjutnya akan diteruskan ke otot (Kumar Praveen J dan Clark Michael L, 2020).

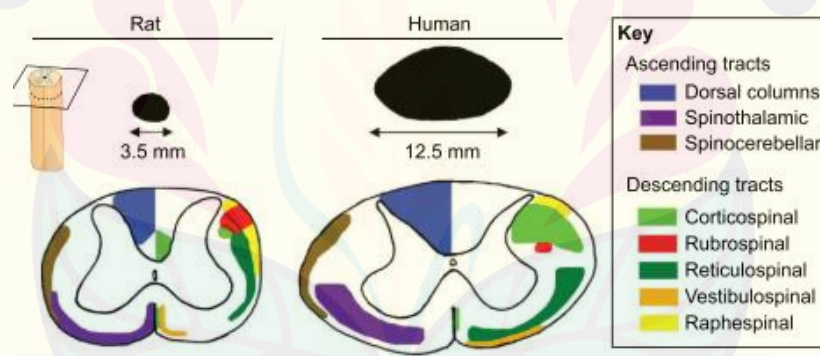
Spinal cord dianggap hanya sebagai penyalur untuk sinyal dari perifer tubuh ke otak, atau berlawanan arah dari otak ke perifer. Anggapan ini kurang benar, banyak fungsi sumsum tulang belakang yang sangat terorganisir misalnya (1) gerakan berjalan; (2) refleks menarik bagian tubuh untuk menjauhi dari hal yang menyakitkan; (3) refleks yang membuat kaki kaku untuk menopang tubuh melawan gravitasi; dan (4) refleks mengontrol pembuluh darah lokal, gerakan gastrointestinal, atau ekskresi urin (Hall dan Hall, 2020).

2.1.3 Anatomi *Spinal Cord* Tikus

Rodentia terdiri dari 29 famili termasuk *Muridae*. *Muridae* memiliki 17 famili yang didalamnya terdapat *Murinae*. *Murinae* memiliki 529 spesies yang

di dalamnya terdapat *Mus (mouse)* dan *Rattus (rat)*. *Rattus* memiliki 4 subgenus dan 78 spesies. Subgenus *Rattus* memiliki 36 spesies termasuk *Rattus norvegicus* (tikus coklat) dan *Rattus rattus* (tikus hitam). Strain *R. Norvegicus* albino biasa digunakan dalam penelitian laboratorium (Treuting dkk., 2018; Maynard dan Downes, 2019).

Spinal cord pada *Rodentia* berbentuk oval pada potongan melintang. *Spinal cord* terdiri dari *gray matter* yang berbentuk kupu-kupu pada pusatnya, dan dikelilingi oleh *white matter* di sekitarnya. Segmen saraf spinal pada *Rodentia* terdiri dari 7 servikal, 13 thorakal, 6 lumbal, 4 sakral, dan 28 kaudal (ekor) untuk *mouse*, sedangkan *rat* memiliki 27-30 kaudal (ekor). Setiap segmen saraf spinal memiliki sekitar 15 dorsal dan 15 ventral akar kecil pada setiap sisinya. *Spinal cord* pada *Rodentia* memiliki *predominant motor tract* pada *rubrospinal* dan memiliki perbesaran lumbosakral pada segmen lumbal 2 sampai dengan lumbal 6 (Treuting dkk., 2018).



Gambar 2.2 Ukuran dan letak *ascending* dan *descending tract* pada tikus dan manusia (Sumber: Kjell dan Olson, 2016).

Pada penelitian SCI, *rat* dianggap lebih mewakili manusia dibandingkan dengan *mouse*. Hal ini disebabkan karena patofisiologi SCI pada *mouse* tidak terjadi pembentukan kista dan terjadi regenerasi langsung setelah terjadinya SCI. Sedangkan pada *rat* akan terjadi pembentukan kista seperti pada manusia dikarenakan *spinal cord rat* dilapisi oleh 3 lapis meninges yaitu *pia mater*, *arachnoid mater* dan *dura mater*. Selain hal tersebut, *rat* yang mengalami SCI

secara komplit, fungsi motorik dan sensorik tidak akan pulih seperti pada manusia (Kjell dan Olson, 2016).

2.2 *Spinal Cord Injury*

Spinal cord injury adalah keadaan neurologis dan patologis destruktif yang menyebabkan disfungsi motorik, sensorik, dan otonom. Kondisi neurologis yang merusak pada SCI menghasilkan ketergantungan fisik, morbiditas, stres psikologis dan beban biaya berobat (Anjum dkk., 2020). Meskipun ada perdebatan tentang apa yang diklasifikasikan sebagai SCI, semua lesi pada *spinal cord*, *conus medullaris* dan *cauda equina* dipertimbangkan dalam konteks SCI (World Health Organization dan ISCS, 2013). *Spinal cord injury* dapat dibagi menjadi dua kategori: traumatik dan non-traumatik. *Traumatic Spinal cord injury* (TSCI) lebih umum dan biasanya disebabkan oleh dampak fisik eksternal (Fan dkk., 2018). Cedera ini disebabkan oleh berbagai penyebab seperti cedera lalu lintas, cedera pekerjaan, olahraga, dan kekerasan (World Health Organization dan ISCS, 2013). Cedera ini dapat berupa kompresi, laserasi, dan memar (Katoh dkk., 2019). *Non-Traumatic Spinal cord injury* (NTSCI) sering disebabkan oleh kompresi tumor, penyakit muskuloskeletal seperti *osteoarthritis*, iskemia vaskuler dan penyakit bawaan seperti spina bifida, yang merupakan cacat tabung saraf yang muncul selama perkembangan embrio. (World Health Organization dan ISCS, 2013; Fan dkk., 2018).

Gejala SCI tergantung pada luasnya cedera atau penyebab, hal ini mencakup hilangnya kontrol sensorik atau motorik tungkai bawah, batang tubuh, dan tungkai atas, serta sebagai hilangnya regulasi otonom tubuh. Hal ini dapat mempengaruhi pernapasan, detak jantung, tekanan darah, kontrol suhu, kontrol usus dan kandung kemih, serta fungsi seksual (World Health Organization dan ISCS, 2013). Sekitar 42% pasien dengan SCI memiliki disfungsi lengkap tanpa gerakan atau sensasi di bawah lokasi cedera. Menariknya, hanya 14,3% dari semua SCI yang diyakini sebagai cedera anatomis lengkap, sedangkan kasus SCI lainnya dianggap sebagai defisiensi

fungsional yang tidak lengkap dengan beberapa koneksi yang dapat dibangun dengan intervensi yang tepat (Kakulas, 2004)

Angka kejadian SCI di dunia berdasarkan perkiraan WHO adalah 40-80 kasus baru per satu juta penduduk per tahun yang berarti terjadi 25.000-50.000 kejadian SCI setiap tahunnya (World Health Organization dan ISCS, 2013). Selama 30 tahun terakhir, prevalensi global SCI meningkat dari 236 menjadi 1298 kasus persatu juta penduduk. Total biaya seumur hidup untuk setiap pasien dengan SCI melebihi 3 juta dolar, dan beban ekonomi tahunan yang dihitung hampir 2,67 miliar dolar di Kanada (Anjum dkk., 2020). Di Amerika Serikat, sekitar 288.000 orang diperkirakan menderita gejala yang disebabkan oleh SCI, dan survei terbaru menunjukkan insiden tahunan SCI adalah sekitar 54 kasus persatu juta orang. Penyebab utama SCI adalah kecelakaan kendaraan bermotor, jatuh, dan tindakan kekerasan. Tetapi dengan bertambahnya usia populasi di banyak negara industri, profil pasien SCI perlahan berkembang menuju lebih banyak pasien SCI pada usia lanjut yang cedera karena jatuh (Katoh dkk., 2019). Di Indonesia (Rumah Sakit Umum Haji Adam Malik Medan) terdapat 44 kasus TSCI yang sebagian besar disebabkan oleh kecelakaan lalu lintas (45,5%) (Siregar, 2012). Angka mortalitas dalam 10 tahun pada negara maju seperti Amerika Serikat adalah 16,2%, Kanada 10,7% dan Australia 14,3% (Lee dkk., 2014). Angka mortalitas dalam 1 tahun pada negara berkembang sebagaimana Nigeria adalah 34,3%, Afrika Selatan 13%, dan Zimbabwe 49% (Cripps dkk., 2011).

2.2.1 Patofisiologi *Spinal Cord Injury*

2.2.1.1 Cedera primer



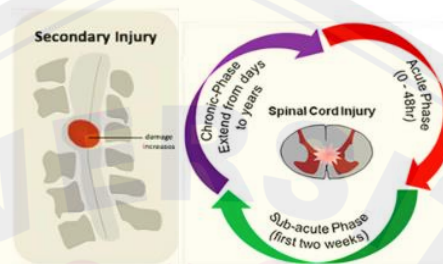
Keterangan: warna merah adalah situs SCI primer

Gambar 2.3 Ilustrasi SCI primer (Sumber: Anjum dkk., 2020)

Proses yang terjadi di dalam SCI dapat dibagi menurut waktu yang telah berlalu dari cedera pencetus menjadi fase akut (<48 jam), sub-akut (48 jam hingga 14 hari), dan kronis (>3 bulan) (Katoh dkk., 2019). Peristiwa traumatik awal yang menyertai atau tidak fraktur dan atau dislokasi kolumna vertebralis, mengakibatkan cedera primer melalui kompresi mekanis, kontusio, peregangan, atau *kinking* dari medula spinalis. Pada fase ini neuron, oligodendrosit, dan komponen lain yang penting untuk transmisi neuron terganggu secara fisik. Dan komponen vaskuler yang terganggu, termasuk *blood spinal cord barrier* (BSCB), menginduksi infiltrasi sel inflamasi (Katoh dkk., 2019). *Spinal cord injury* akut biasanya terjadi karena trauma mendadak pada tulang belakang dan mengakibatkan patah tulang, serta dislokasi tulang belakang. Tahap awal segera setelah cedera dikenal sebagai cedera primer dengan ciri-ciri adanya fragmen tulang dan robekan ligamen tulang belakang. *Spinal cord injury* dicapai dalam dua fase: fase pertama meliputi penghancuran parenkim saraf, gangguan jaringan aksonal, perdarahan, dan gangguan membran glial. Penentu utama keparahan SCI adalah tingkat kerusakan awal dan durasi kompresi sumsum tulang belakang. Sebuah kaskade yang terkait dengan cedera sekunder diaktifkan oleh timbulnya perubahan biokimia,

mekanik dan fisiologis dalam jaringan saraf. Meskipun manifestasi klinis menunjukkan hilangnya fungsional lengkap, beberapa segmen tetap terhubung oleh beberapa akson selama fase SCI primer, sehingga mencerminkan keadaan cedera tidak lengkap dan parsial (Anjum dkk., 2020).

2.2.1.2 Cedera sekunder



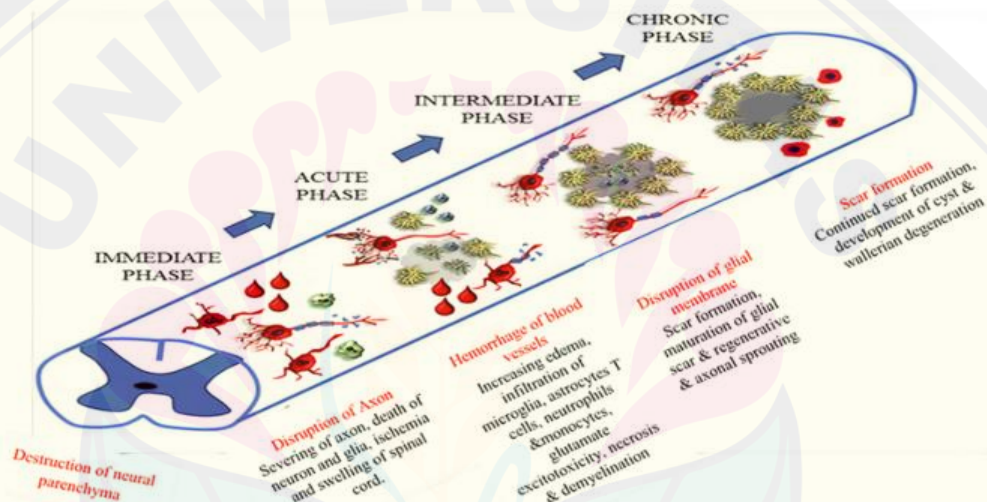
Keterangan: tanda merah adalah situs SCI sekunder

Gambar 2.4 Ilustrasi dan skema alur pada SCI sekunder (Sumber: Anjum dkk., 2020)

Cedera awal memicu kaskade cedera sekunder yang menyebabkan kerusakan kimia dan fisik lebih lanjut pada sumsum tulang belakang dan defisit neurologis yang dihasilkan. Peningkatan glutamat menghasilkan eksitotoksitas neuron karena akumulasi Ca^{2+} intraseluler, menyebabkan peningkatan spesies oksigen reaktif (ROS). Peningkatan ROS akan merusak komponen seluler seperti asam nukleat, protein, dan fosfolipid, serta dilanjutkan dengan disfungsi neurologis (Kato dkk., 2019).

Fase cedera sekunder mencerminkan proses patologis dengan banyak sifat. Fase ini terjadi setelah fase cedera primer dan berlangsung selama beberapa minggu. Manifestasi klinis cedera sekunder meliputi peningkatan permeabilitas sel, sinyal apoptosis, iskemia, kerusakan pembuluh darah, edema, eksitotoksitas, deregulasi ionik, inflamasi, peroksidasi lipid, pembentukan radikal bebas, demielinasi, degenerasi Wallerian, scar fibro glial dan pembentukan kista (Anjum dkk., 2020).

Pembuluh darah yang terganggu menyebabkan perdarahan hebat dan memungkinkan infiltrasi sel-sel inflamasi termasuk neutrofil, monosit/makrofag, sel T, dan sel B ke dalam jaringan *spinal cord* yang melepaskan sitokin inflamasi TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , dan IL-6. Sitokin ini mencapai puncaknya pada 6-12 jam setelah cedera, selanjutnya menginduksi respon inflamasi yang luar biasa selama fase akut ke sub-akut yang memperluas lesi ke arah rostral dan kaudal. Mikroglia yang teraktivasi dan makrofag yang diinfiltrasi telah terbukti bertanggung jawab atas nekrosis dan apoptosis neuron, astrosit, maupun oligodendrosit yang berada di sekitar lesi, selanjutnya memperburuk hasil neurologis (Katoh dkk., 2019).



Gambar 2.5 Skema alur pada SCI primer dan sekunder (Sumber: Anjum dkk., 2020).

Cedera sekunder dikategorikan menjadi tiga fase: cedera akut, sub-akut dan kronis. Setelah fase cedera primer, inisiasi fase cedera sekunder akut mulai dimanifestasikan melalui gambaran klinis berupa perdarahan, edema, dan inflamasi. Hal ini akan menyebabkan nekrosis substansial yang memicu eksitotoksisitas glutamat (Anjum dkk., 2020).

Pada fase sekunder sub-akut, glutamat akan berinteraksi dengan N-metil-D-aspartat (NMDA) dan asam-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propionat (AMPA). Hiperaktivitas dari reseptor NMDA dan AMPA

meningkatkan influks dari ion Na^{2+} dan Ca^{2+} . Tingginya Ca^{2+} di sitosol mengaktifkan kompleks 1 yang terdiri dari NADH dehidrogenase sehingga terjadi peningkatan pembentukan ATP dan ROS. Akumulasi Ca^{2+} di sitosol yang tinggi mengakibatkan permeabilitas membran dan peningkatan pori-pori *mitochondrial permeability transition pores* (mPTPs). Pembukaan mPTP akan mengganggu gradien proton dan menonaktifkan produksi ATP, sehingga meningkatkan masuknya air dan komponen lain ke dalam matriks mitokondria yang menyebabkan pembengkakan sel yang berakhir pada kematian sel (nekrosis dan apoptosis). Apoptosis pada oligodendrosit menyebabkan demielinasi akson yang menyebabkan hilangnya stabilitas dan fungsi akson (Anjum dkk., 2020).

Pada fase kronik, mulai terjadi penyembuhan pada SCI dengan astrogliosis yang akan menginduksi pembentukan jaringan parut oleh astrosit. Pembentukan jaringan parut tidak hanya melibatkan astrosit, tetapi terdapat perisit yang akan mendorong fibroblas untuk mengekspresikan matriks ekstraseluler seperti fibronektin. Ketika terjadi nekroptosis pada astrosit melalui persinyalan TLR4/MyD88 akan muncul respon inflamasi yang akan membentuk suatu kista (Anjum dkk., 2020).

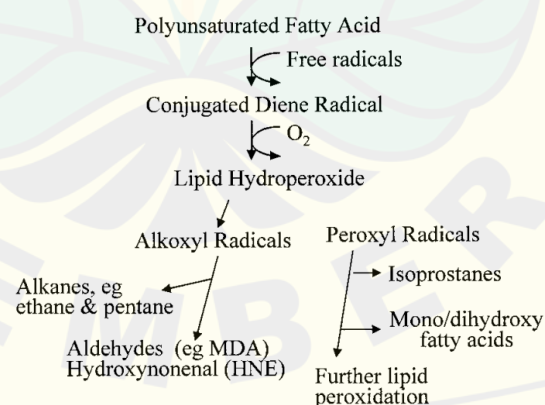
2.3 F2-Isoprostan

2.3.1 Definisi

F2-isoprostan (F2-isoPs) adalah produk *non-siklooksigenase* yang dihasilkan dari induksi radikal bebas terhadap asam arakidonat dari membran fosfolipid dan lipoprotein. F2-isoprostan lebih spesifik, sensitif, dan stabil dibandingkan penanda peroksidasi yang diinduksi stres oksidatif lainnya (Koner mann, 2019). Stres oksidatif adalah kondisi ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan antioksidan. Hal tersebut mendukung oksidasi yang menyebabkan peroksidasi lipid, protein membran, dan kerusakan *deoxyribonucleic acid* (DNA) (Morel dkk., 2014). Selain itu, F2-isoprostan kurang reaktif dibandingkan produk peroksidasi lipid lainnya dan merupakan

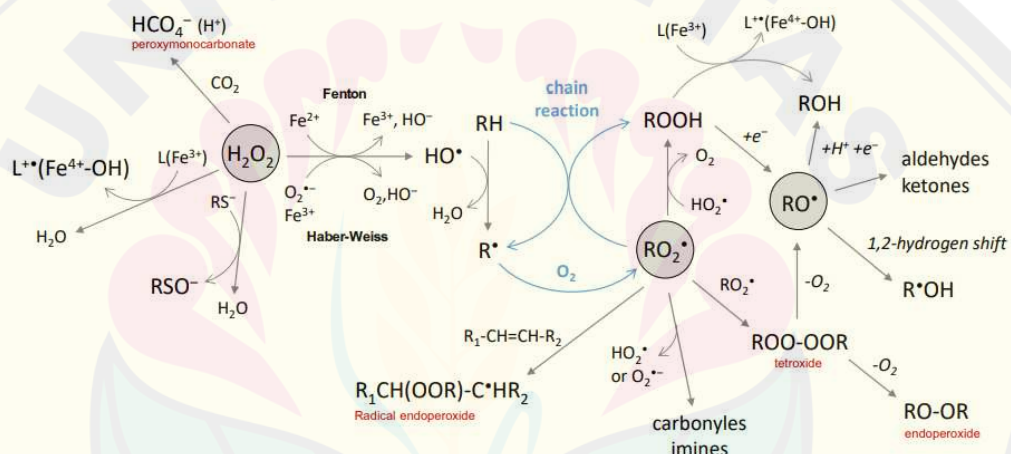
penanda yang berguna untuk penilaian stres oksidatif *in vivo* (Mayer dan Human, 2001). F2-isoprostan dapat memediasi inisiasi dan perkembangan penyakit kronis sehingga F2-isoprostan dapat dijadikan penanda mendasar untuk mengukur stres oksidatif dalam tubuh yang memiliki efek biologis kuat yang terkait dengan peradangan (Di Stefano dkk., 2018). Hal ini berhubungan dengan peningkatan konsentrasi F2-isoprostan dalam jaringan telah terbukti berkorelasi dengan stres oksidatif dan tingkat keparahan penyakit (Woolcock dkk., 2020b). F2-isoprostan pada manusia dapat dideteksi pada semua jaringan dan cairan biologis, termasuk dalam bentuk spesimen plasma, urin, dan cairan serebrospinal, cairan *lavage bronchoalveolar*, dan empedu, serta berbagai jaringan (Milne dkk., 2008; Konermann, 2019).

Penelitian F2-isoprostan pada hewan telah dilakukan pada tikus, babi, kelinci, kuda, anjing, dan sapi. Sampel yang digunakan beragam mulai dari jaringan cairan plasma dan urin; serta jaringan pada ginjal, jantung, paru-paru, dan kandung kemih. Penelitian-penelitian tersebut menggunakan F2-isoprostan sebagai penanda oksidatif stres pada neurodegenerasi seperti SCI, iskemia, disfungsi kandung kemih, infeksi saluran kemih, penuaan, obesitas, dan kanker pada saluran kemih (Basu dkk., 2000; Basu dkk., 2001; Roberts dan Reckelhoff, 2001; Jeusette dkk., 2009; Clayton dkk., 2014; Woolcock dkk., 2020a; Woolcock dkk., 2020b; Putman dkk., 2021).



Gambar 2.6 Skema pembentukan F2-isoprostan (Sumber: Spittle dkk., 2001)

Pada pembentukan F2-isoprostan, hal yang paling utama dibutuhkan adalah asam arakidonat, oksigen molekuler dan radikal bebas. Tidak seperti prostaglandin primer yang diturunkan dari siklooksigenase (COX), isoprostan dibentuk secara *in situ* yang diesterifikasi dengan jaringan fosfolipid dan kemudian dilepaskan dalam bentuk *free acid* setelah hidrolisis, yang diasumsikan dilakukan oleh fosfolipase. Tahap pembelahan enzim secara teoritis merupakan tahap pembatas kecepatan yang penting untuk pembentukan dan pelepasan isoprostan bebas dalam sirkulasi, yang dapat dilakukan sinkronisasi oleh berbagai faktor endogen atau eksogen (Basu, 2007). Berdasarkan Gambar 2.6 diatas, F2-isoprostan dihasilkan oleh *peroxyl radical* (Spittle dkk., 2001).



Gambar 2.7 Skema pembentukan *endoperoxide* (Sumber: Collin, 2019)

Peroxyl radical berasal dari *hydroxyl radical*. *Peroxyl radical* akan membentuk *Hydroperoxide* dan *tetroxide*. Reduksi oxygen pada *tetroxide* akan membentuk *endoperoxide* (Collin, 2019). *Endoperoxide* akan mengalami reduksi oleh *peroxidase* seluler yang difasilitasi oleh tingginya kadar lokal *glutathione* dan *α -tocopherol* (Musiek dkk., 2005). Setelah terjadi proses reduksi, senyawa tersebut akan berinteraksi dengan *phospholipase A2* dan akan melepaskan 8-*epi*-PGF2 α dalam bentuk bebas (Ligor dan Olszowy, 2012).

2.3.2 Pengukuran F2-Isoprostan

Pengujian F2-isoprostan dapat dilakukan dengan beberapa teknik. Teknik-teknik yang dapat digunakan adalah *gas chromatography-mass spectrometry*, *enzyme immunoassay* dan *radioimmunoassay* (Jia dkk., 2012). Pengukuran F2-isoprostan dalam urin dan plasma adalah pengukuran paling nyaman dan tidak invasif. Pengukuran dalam plasma atau urin dapat mewakili produksi endogennya, dengan demikian pengukuran ini dapat memberikan indeks stres oksidatif *in vivo* yang sangat tepat dan akurat (Milne dkk., 2008). Pada pemeriksaan F2-isoprostan kuantitatif menggunakan *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) digunakan kit komersial (*Enzyme immunoassay* untuk F2-isoprostan). Pertama sampel diencerkan sesuai dengan instruksi pabrik. Lalu sampel dan standar dimasukkan ke dalam sumuran. Sumuran merupakan tempat F2-isoprostan mengikat antibodi poliklonal pada *plate*. Pada saat F2-isoprostan berikatan dengan antibodi poliklonal, dan *Horseradish peroxidase* kalah bersaing untuk berikatan akan menciptakan perubahan kalorimeter. Dan akhirnya ditambahkan asam sulfat 3N (Sigma Aldrich) untuk menghentikan proses pengikatan. Nilai absorbansi dari pemeriksaan ini diukur menggunakan *microplate reader* (Synergy HT; Biotek) dengan besar gelombang 450 nm. Hasilnya akan dibuat kurva standar dan akhirnya dianalisis secara statistik (Woolcock dkk., 2020b).

2.4 Stem Cell

Stem cell adalah sel yang berasal dari jaringan embrionik, janin, dan dewasa dan memiliki kemampuan diferensiasi yang berupa jaringan lunak dan organ. Selama tahap kehidupan, jaringan *stem cell* spesifik ditemukan di berbagai organ dan memainkan peran penting dalam perbaikan setelah cedera organ. Ciri-ciri utama *stem cell* adalah: (a) pembaruan diri (kemampuan untuk berproliferasi secara luas), (b) klonalitas (biasanya berasal dari satu sel), dan (c) potensi (kemampuan berdiferensiasi menjadi sel yang berbeda) (Kolios dan Moodley, 2013).

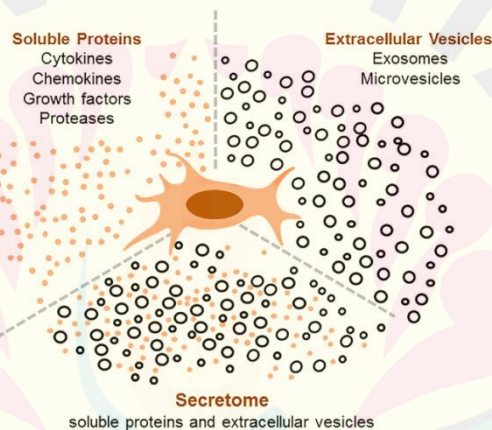
Stem cell berdasarkan tahap perkembangannya dibagi menjadi dua jenis yaitu: *Embryonic Stem Cell* (ESC), yang diisolasi dari kelompok sel blastokista, dan *Adult Stem Cell* (ASC) yang dikenal sebagai *Somatic Stem Cell* (SSC). *Somatic stem cell* ditemukan di berbagai jaringan dewasa, termasuk *Neural Stem Cell* (NSC), *Hematopoietic Stem Cell* (HSC), *Mesenchymal Stem Cell* (MSC), dan *epidermal stem cell* dan sebagainya. Sedangkan pada potensi diferensial, *stem cell* dapat dibagi menjadi tiga kategori: *stem cell* totipotensi, *Pluripotent Stem Cell* (PSC), dan *stem cell* unipoten (Gao dkk., 2018). Sedangkan menurut Kolios dan Moodley pada tahun 2013, *stem cell* dapat dikategorikan menurut potensi diferensiasinya menjadi 5 kelompok: totipoten atau omnipoten, pluripoten, multipoten, oligopoten, dan unipoten.

Sel totipoten atau sel omnipoten adalah sel yang paling tidak berdiferensiasi dan ditemukan pada perkembangan awal. Contoh *stem cell* totipoten adalah sebuah oosit yang dibuahi. Sedangkan PSC dapat berdiferensiasi menjadi sel yang muncul dari 3 lapisan germinal, yaitu ektoderm, endoderm, dan mesoderm. Contoh PSC adalah ESC dan *induced pluripotent stem cells* (iPSCs). Lalu *stem cell* multipoten ditemukan di sebagian besar jaringan dan berdiferensiasi menjadi sel dari lapisan germinal tunggal. Contohnya adalah MSC yang berasal dari berbagai jaringan termasuk sumsum tulang, jaringan adiposa, tulang, *wharton's jelly*, darah tali pusat, dan darah tepi. Sel-sel ini dapat berdiferensiasi menjadi jaringan turunan mesoderm berupa jaringan adiposa, tulang, tulang rawan, dan otot. Selain itu sel ini berdiferensiasi menjadi jaringan turunan ektoderm berupa jaringan saraf. Selanjutnya sel induk oligopoten mampu memperbaharui diri dan membentuk 2 atau lebih garis keturunan dalam jaringan tertentu. Misalnya *stem cell* hematopoietik, karena mereka dapat berdiferensiasi menjadi garis keturunan *myeloid* dan *limfoid*. Kemudian *stem cell* unipoten yang dapat memperbaharui diri dan berdiferensiasi menjadi hanya satu jenis sel tertentu dan membentuk garis keturunan tunggal seperti sel induk otot, sehingga menghasilkan sel otot dewasa dan bukan sel lain (Kolios dan Moodley, 2013).

2.4.1 Neural Stem Cell (NSC)

Neural Stem Cell adalah sel multipoten yang dapat memperbaharui diri dan berproliferasi tanpa batas yang dapat menghasilkan sel-sel progenitor dan berakhir dengan berdiferensiasi menjadi neuron, astrosit, dan oligodendrosit. *Neural stem cell* dapat diisolasi dari otak dan *spinal cord*. Pada otak ditemukan pada *subventricular zone (SVZ)* yang melapisi ventrikel lateral otak depan dan lapisan subgranular dari *dentate gyrus* dari hipokampus. Pada *spinal cord* ditemukan pada ventrikel kanalis sentralis dan batas pial (Lee dkk., 2015).

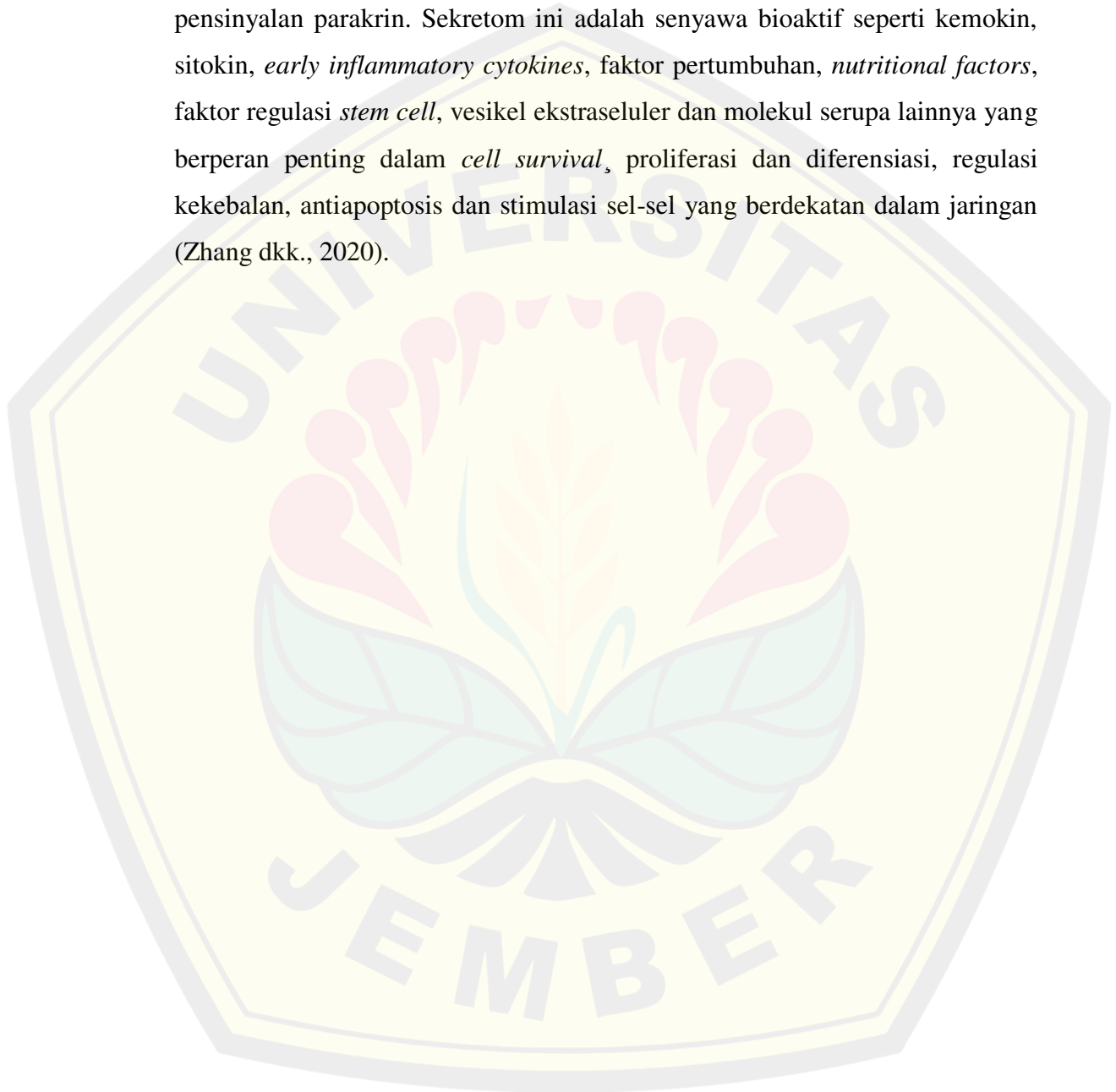
2.5 Sekretom Stem Cell



Gambar 2.8 Sekretom (Sumber: Driscoll dan Patel, 2019).

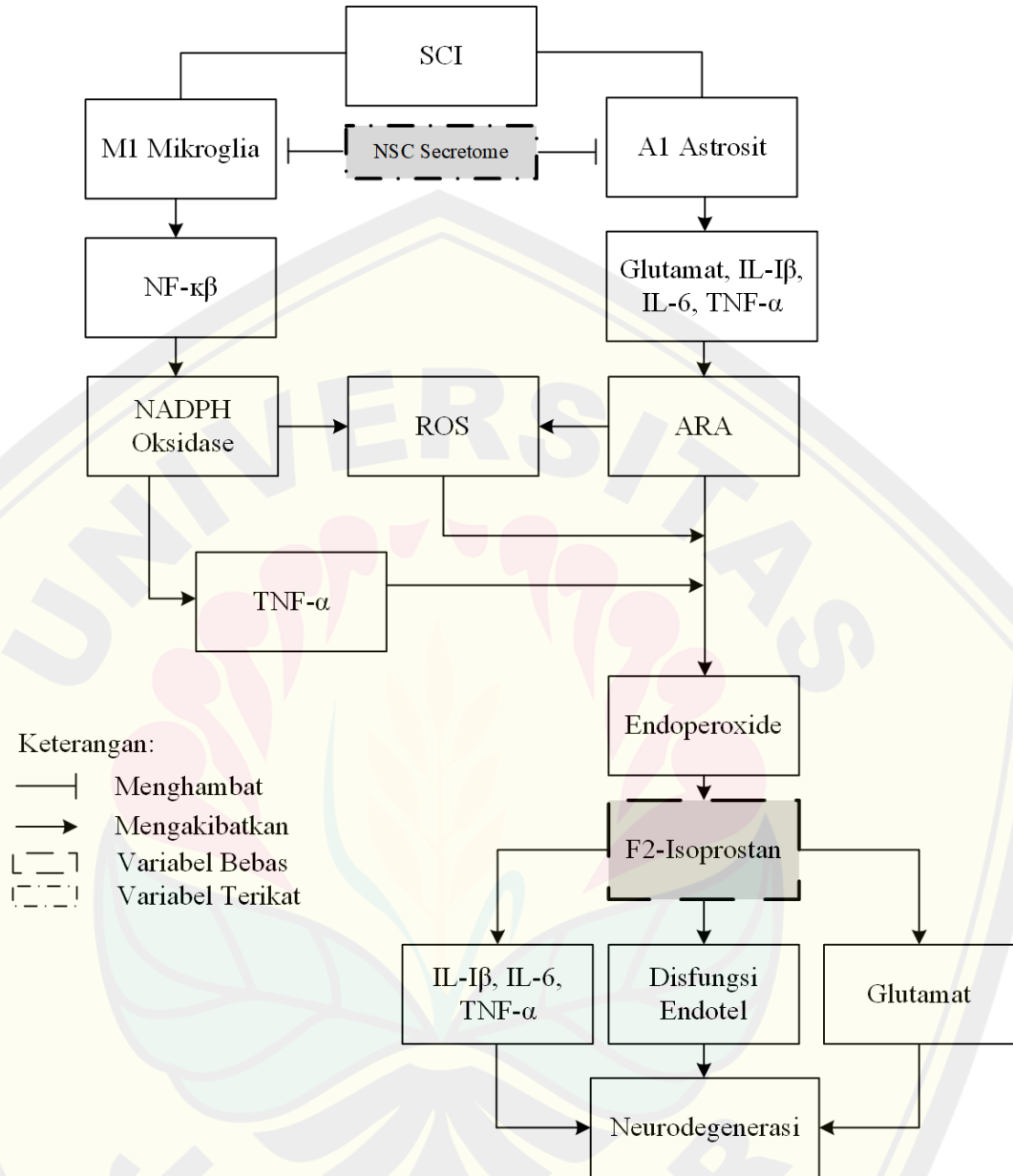
Sekretom atau disebut dengan *Conditioned Media (CM)* merupakan kumpulan komponen yang diproduksi oleh sel, terdiri dari protein terlarut (sitokin, kemokin, faktor pertumbuhan dan protease) dan vesikel ekstraseluler (*exosomes*, *ectosomes*, dan *microvesicles*) (Driscoll dan Patel, 2019; Kalluri dan LeBleu, 2020). Sekretom *Stem cell* berfungsi untuk komunikasi antar sel. Pengkodean sekretom sekitar 10% oleh genom manusia yang mencakup beragam protein serum, faktor pertumbuhan, faktor angiogenik, hormon, sitokin, protein matriks ekstraseluler, protease matriks ekstraseluler, hormon, mediator lipid dan materi genetik. *Stem cell* mensekresikan molekul sekretom melalui mekanisme sekresi klasik dan non-klasik, berupa translokasi protein,

eksositosis, dan enkapsulasi vesikel atau eksosom. Sekretom yang dieksresikan oleh *stem cell* dapat memediasi jalur intraseluler secara langsung dan tidak langsung pada sel yang *injury*. Mediasi pada jalur intraseluler dengan menginduksi sekresi produk yang aktif secara fungsional dari jaringan yang berdekatan (Xia dkk., 2019). Sekretom melakukan respon antar sel melalui pensinyalan parakrin. Sekretom ini adalah senyawa bioaktif seperti kemokin, sitokin, *early inflammatory cytokines*, faktor pertumbuhan, *nutritional factors*, faktor regulasi *stem cell*, vesikel ekstraseluler dan molekul serupa lainnya yang berperan penting dalam *cell survival*, proliferasi dan diferensiasi, regulasi kekebalan, antiapoptosis dan stimulasi sel-sel yang berdekatan dalam jaringan (Zhang dkk., 2020).



2.6 Kerangka Teori

Kerangka teori dapat dilihat pada Gambar 2.1 berikut:



Gambar 2.9 Skema kerangka teori

Pada SCI terjadi proses neuroinflamasi, hal ini akan mengaktifkan astrostit dan mikroglia melalui *Toll-like receptors* (TLR). Aktivasi mikroglia akan mengaktifkan NF-κβ, aktivasi ini mengekspresikan *NADPH oxidase*. *NADPH oxidase* akan menghasilkan ROS dan mengekspresikan TNF-α. *Tumor necrosis factor-α* akan menginduksi cPLA2 Sedangkan aktivasi A1 astrostit 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 pembentukan prostaglandin (PGs), leukotriene (LT), lipoxins (LX), dan tromboksan (TX), serta asam hidroksi eikosatrienoat (HETE), asam epoksi eikosatetraenoat (EET), asam 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 mengaktifasi NF- κ β dan mengoksidasi ARA (Akhlaq A. Farooqui, 2014).

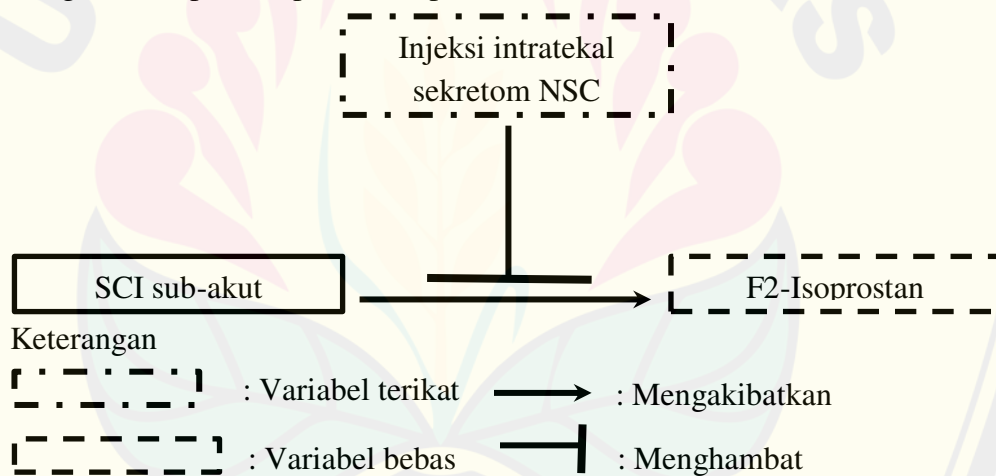
Hal yang utama yang dibutuhkan dalam pembentukan F2-isoprostan adalah asam arakidonat, oksigen molekuler dan radikal bebas (Basu, 2007). F2-isoprostan dihasilkan dari induksi radikal bebas terhadap asam arakidonat neuronal dari membran fosfolipid dan lipoprotein (Konermann, 2019). Induksi radikal bebas terhadap ARA, akan membentuk *peroxyl*. *Peroxyl* akan membentuk *tetroxide* agar seimbang. *Tetroxide* yang mengalami reduksi O₂ akan membentuk *endoperoxide*, *endoperoxide* akan membentuk F2-isoprostan (Spittle dkk., 2001; Musiek dkk., 2005; Ligor dan Olszowy, 2012; Collin, 2019). F2-isoprostan akan berikatan dengan reseptor TX yang akan menyebabkan disfungsi endotel (Bauer dkk., 2014). Selain itu, F2-isoprostan yang berikatan dengan reseptor TX akan memediasi aktivitas platelet (Akhlaq A. Farooqui, 2014). Platelet yang teraktivasi akan mensintesis dan mengeluarkan IL-1 β , IL-6, and TNF- α (Chen dkk., 2020). Menurut Opere et al. (2005) dalam Akhlaq A. Farooqui, (2014), 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 (Akhlaq A. Farooqui, 2014; Liao dkk., 2020; Ray, 2020).

Semua faktor atau molekul *stem cell* yang disekresikan ke ruang ekstraseluler disebut sebagai sekretom stem cell (Meiliana dkk., 2019).

Sekretom NSC berisi sitokin seperti IL-10, IL-4 dan TGF- β (Willis dkk., 2020). Interleukin-10 dan TGF- β pada sekretom NSC 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 (Li dkk., 2022). M2 makrofag akan memproduksi IL-10 yang akan mengekspresikan A2 astrosit. A2 astrosit ini akan menghasilkan TGF- β yang akan mensupresi M1 (Liu dkk., 2020). TGF- β juga berperan untuk menginduksi polarisasi A1 astrosit menjadi non-reaktif astrosit (Baldwin dan Eroglu, 2017).

2.7 Kerangka Konseptual dan Hipotesis Penelitian

Kerangka konseptual dapat dilihat pada Gambar 2.2 berikut:



Gambar 2.10 Skema kerangka konsep

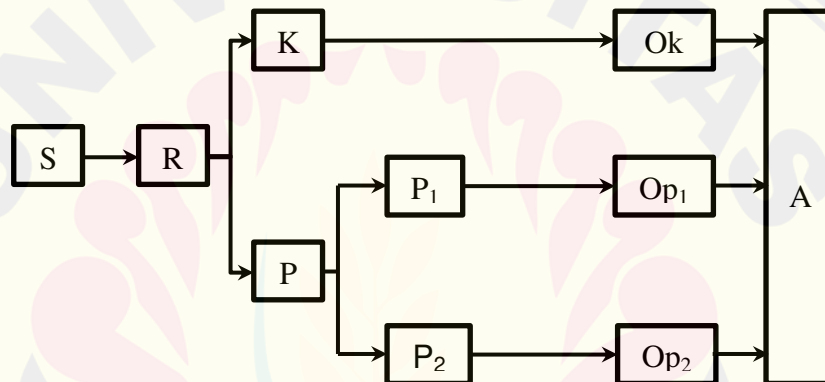
Patofisiologi SCI pada fase sekunder, terjadi kenaikan radikal bebas seperti ROS dan *reactive nitrogen species* (RNS) yang disebabkan oleh aktivitas mikroglia dan astroglia (Akhlq A. Farooqui, 2014). Kenaikan ROS dan RNS yang tinggi, dapat menginduksi kerusakan seperti peroksidasi lipid. Peningkatan ROS/RNS pada SCI sekunder fase sub-akut, dapat meningkatkan F2-isoprostane. Hal ini bisa terjadi dikarenakan F2-isoprostane terbentuk dari

induksi radikal bebas terhadap asam arakidonat (Konermann, 2019). Selain hal tersebut, peningkatan ROS dapat menyebabkan apoptosis melalui jalur eksternal (Anjum dkk., 2020). Peningkatan ROS/RNS yang disebabkan oleh SCI dapat dihambat dengan menekan aktivitas proinflamasi menggunakan sekretom NSC. Penekanan ini dilakukan dengan mengubah polarisasi mikroglia menjadi M2 dan astroglia menjadi A2 (Baldwin dan Eroglu, 2017; Liu dkk., 2020). Selain itu, sekretom NSC akan meningkatkan *growth factor* berupa BDNF yang akan menghentikan proses apoptosis (Uribe dan Wix, 2012; Wurzelmann dkk., 2017; Anjum dkk., 2020). Berdasarkan kerangka konsep tersebut, hipotesis pada penelitian ini adalah injeksi intratekal sekretom pada tikus *Sprague dawley* dengan *spinal cord injury* berefek terhadap penurunan kadar F2-isoprostan.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian *true experimental* yang bersifat kuantitatif dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pada penelitian ini dilakukan pendekatan menggunakan *post test only-control group*. Metode pendekatan ini dilakukan untuk mengetahui kadar F2-isoprostan pada tikus yang tidak diinjeksi dan diinjeksi intratekal sekretom NSC. Berikut adalah skema rancangan penelitian pada gambar 3.1:



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan:

S : Sampel

R : Randomisasi

K : Kelompok kontrol

Ok : Observasi pada kelompok kontrol

P₁ : Perlakuan SCI + injeksi intratekal sekretom NSC

P₂ : Perlakuan SCI tanpa intratekal sekretom NSC

Op₁ : Observasi kelompok perlakuan SCI + injeksi intratekal sekretom NSC

Op₂ : Observasi perlakuan SCI tanpa injeksi intratekal sekretom NSC

A : Analisis

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dikerjakan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi, Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Alokasi waktu September-Desember 2021. Rincian tempat kegiatan dapat dilihat pada tabel 3.1 berikut:

Tabel 3.1 Rincian tempat penelitian

| No | Tempat | Kegiatan |
|----|---|---|
| 1. | Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi | Aklimatisasi hewan coba, pemberian perlakuan dan pengambilan sampel darah |
| 2. | Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran | Penyimpanan sampel plasma |
| 3. | Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran | Pemeriksaan F2-isoprostan menggunakan ELISA |

Rincian waktu kegiatan dapat dilihat pada tabel 3.2 berikut:

Tabel 3.2 Rincian waktu penelitian

| No. | Kegiatan | Waktu Hari ke- (jumlah hari/bulan) |
|-----|----------------------------------|---|
| 1. | Aklimatisasi | 1-7 (7 hari) September 2021 |
| 2. | Pembuatan model SCI | 8 (1 hari) September 2021 |
| 3. | Injeksi intratekal sekretom NSC | 10 (1 hari) September 2021 |
| 4. | Perawatan hewan coba | 9-36 (28 hari) September – Oktober 2021 |
| 5. | Terminasi dan pengambilan sampel | 35 (1 hari) Oktober 2021 |
| 6. | Penyimpanan sampel | 36-95 (2 bulan) Oktober 2021 |
| 7. | Pemeriksaan F2-isoprostan | 96 (1 hari) Desember 2021 |

3.3 Karakteristik Hewan Coba dan Jumlah Replikasi

3.3.1 Karakteristik Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Sprague dawley*. Tikus ini dikembangkan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM Yogyakarta. Kriteria inklusi yang digunakan adalah jenis kelamin jantan, berumur 3-4

bulan, berat badan 300-350 gram, galur murni, dan sehat dengan keterangan sehat yang diberikan oleh dokter poliklinik hewan. Kriteria sehat pada hewan coba ini adalah feses tidak lembek, gerakan yang aktif, tidak agresif, bulu yang halus dan lebat, serta mata terang dan jernih. Sedangkan, kriteria eksklusi dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Sprague dawley* telah mendapatkan terapi imunomodulator. Lalu dikeluarkan dari sampel atau masuk dalam kriteria *drop out* apabila hewan coba mengalami kematian.

3.3.2 Jumlah Replikasi

Jumlah replikasi pada penelitian ini dihitung menggunakan rumus *Resource equation* dengan nilai *E-value* antara 10-20 yang menunjukkan jumlah sampel yang adekuat (Charan dan Kantharia, 2013). Perhitungan yang dilakukan sebagai berikut:

$E = \text{Jumlah hewan yang digunakan} - \text{Jumlah Kelompok}$

$$E = (n \times t) - t$$

$$E = (5 \times 3) - 3$$

$$E = 15 - 3$$

$$E = 12$$

Keterangan:

E: Total jumlah hewan yang digunakan - total kelompok

n: Besar sampel yang dihitung

t: Jumlah kelompok perlakuan

Perhitungan ini menghasilkan nilai E sebesar 12 ekor. Nilai E= 12 berada dalam kisaran *E-value* yang adekuat sehingga digunakan 15 ekor tikus yang dipilih secara acak. Mengantisipasi kematian hewan coba dalam penelitian, dibutuhkan cadangan sampel 20%. Perhitungan sampel cadangan menggunakan rumus (Sastroasmoro dan Ismael, 2011) sebagai berikut

$$\text{Sampel cadangan} = n' - t$$

Perhitungan n' sebagai berikut:

$$n' = [n/1-f]$$

$$n' = [5/1-0,2]$$

$$n' = [5/0,8]$$

$$n' = 6,25$$

$$n' \approx 6$$

sehingga perhitungan sampel cadangan dari n' diatas adalah:

$$\text{Sampel cadangan} = n' - t$$

$$\text{Sampel cadangan} = 6 - 5$$

$$\text{Sampel cadangan} = 1$$

Berdasarkan perhitungan diatas maka sampel cadangan yang dibutuhkan tiap kelompok perlakuan untuk mengantisipasi kematian adalah 1 ekor untuk setiap kelompok.

3.4 Jenis dan Sumber Data

Jenis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah data primer yang berupa rasio dari kadar F2-isoprostan dari hewan coba yang telah dimodifikasi *spinal cord injury*. Data ini diperoleh dengan pemeriksaan biomarker F2-isoprostan menggunakan metode ELISA.

3.5 Variabel Penelitian

Variabel penelitian dapat dilihat pada tabel 3.2 berikut:

Tabel 3.2 Variabel Penelitian

| No. | Variabel | Keterangan |
|-----|------------------|---------------|
| 1. | Variabel Terikat | F2-isoprostan |
| 2. | Variabel bebas | Sekretom NSC |

3.6 Definisi Operasional dan Skala Pengukuran

Definisi operasional dapat dilihat pada tabel 3.3 berikut:

Tabel 3.3 Definisi Operasional

| Variable | Definisi Operasional | Indikator | Alat Ukur | Skala Data |
|--|--|-----------------------------------|--|------------|
| Bebas : Sekretom <i>Neural Stem Cell</i> | Suatu materi tanpa sel yang diekskresikan oleh NSC yang terdiri dari protein terlarut (sitokin, kemokin, faktor pertumbuhan dan protease) dan vesikel ekstraseluler (<i>exosomes, ectosomes, dan microvesicles</i>) yang diinjeksi intratekal pada tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) strain <i>Sprague dawley</i> setelah 3 hari pembentukan model SCI dengan dosis 30 μ l yang diperoleh dari <i>Cell and Tissue Bank</i> RSUD dr. Soetomo . | 1) Dosis 2) Injeksi intratekal | SOP | Nominal |
| Terikat: F2-isoprostan | Penanda stres oksidatif yang terbentuk dari peroksidase <i>arachidonic acid</i> oleh radikal bebas yang diobservasi setelah 28 hari pembuatan model SCI.. | Kadar F2-isoprostan | ELISA 8-Epi-Prostaglandin F2 Alpha dari Elabscience® | Rasio |

3.7 Instrumen Penelitian

3.7.1 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Alat yang digunakan untuk menimbang berat badan hewan coba yaitu: neraca *balance* digital
- b. Alat pemeliharaan hewan coba yaitu:
 - 1) Kandang hewan coba
 - 2) Wadah makan
 - 3) Botol minum

c. Alat modifikasi hewan coba yaitu:

- 1) Yasargil clip
- 2) Gunting operasi
- 3) Needle holder
- 4) Jarum operasi (suture needle)
- 5) Benang operasi (catgut)
- 6) Arteri claim
- 7) Pinset
- 8) Scalpel, paratuse case (etui)
- 9) Weitlaner retractor
- 10) Penjepit
- 11) Pisau bedah ukuran kecil (no. 11,12, 15)
- 12) Gunting operasi metzenbaum bengkok (15,5 cm)
- 13) Gunting metzenbaum scissors straight standart
- 14) Volkman retractor
- 15) Papan fiksasi

d. Alat terminasi hewan coba yaitu toples kaca

e. Alat pemberian sekretom *neural stem cell* yaitu *neuros syringe* 5 μ L

f. Alat pengukuran F2-isoprostan yaitu:

- 1) ELISA kit F2-isoprostan
- 2) ELISA reader

3.7.2 Bahan penelitian

a. Hewan coba penelitian yaitu:

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley* yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi.

b. Makanan dan minuman hewan coba yaitu:

Makanan yang diberikan kepada hewan coba adalah pakan ternak standar. Dan minuman hewan coba adalah air mineral.

- c. Perlakuan dan pemeriksaan menggunakan bahan yaitu:
- 1) Sekretom *neural stem cell*
 - 2) Bahan operasi modifikasi *spinal cord injury* yaitu ketamin, acepromazin, betadine, alkohol, kapas, dan kassa
 - 3) Bahan terminasi yaitu *eter*

3.8 Prosedur Penelitian

Proses awal yang dilakukan adalah aklimatisasi hewan coba. Proses ini dilakukan selama 7 hari. Hewan coba dilakukan pemeliharaan pada kondisi terkontrol dan terstandar dengan kondisi 12 jam siklus terang dan gelap. Hewan coba dimasukan dalam kandang yang memiliki alas berupa sekam dengan anyaman kawat sebagai pembatas kandang. Makanan dan minuman diberikan secara peroral berupa pakan ternak standar dan air.

Sebelum proses operasi, dilakukan pengelompokan hewan coba berdasarkan perhitungan besar sampel didapatkan kebutuhan hewan coba sebanyak 15 ekor. Hewan coba yang telah masuk kriteria inklusi dan tidak masuk dalam kriteria eksklusi maupun *drop out* dilakukan pengelompokan menggunakan *simple random sampling*. Pengelompokan ini terdiri dari kelompok normal, kelompok kontrol yang dilakukan model SCI tanpa pemberian sekretom NSC, dan kelompok perlakuan yang dilakukan model SCI dan mendapatkan pemberian intratekal sekretom NSC sebanyak 30 μ l (Cizkova dkk., 2018). Pemberian sekretom NSC secara intratekal dipilih karena diakui sebagai metode yang mudah, kurang invasif dan dapat melewati cairan serebrospinal sampai dengan tempat cedera. Selain itu, injeksi intratekal sekretom dalam banyak penelitian terbukti berhasil dan memiliki hasil yang baik dalam memperbaiki fungsi motorik hewan coba, dan juga dapat diaplikasikan secara klinis (Cizkova dkk., 2018; Mohammed dkk., 2020; Salwierak-Głońska dkk., 2022).

Proses operasi diawali dengan pembiusan dengan *acepromazine* 2 ml/KgBB dan ketamin dengan dosis 40 ml/KgBB. Setelah hewan tidak sadar,

hewan coba diletakkan pada papan fiksasi dengan posisi pronasi. Setelah itu rambut dicukur pada bagian punggung sekitar Thorakal 10-Thorakal 12. Setelah rambut tercukur, dilakukan desinfeksi pada bagian operasi dengan betadine 10% dan alkohol 75%. Lalu daerah operasi ditutup kain steril dan dilakukan identifikasi Thorakal 12 (T12) dengan meraba *costae 12*. Setelah teridentifikasi dilakukan insisi kulit sepanjang 4 cm. Hewan coba yang mengalami perdarahan dilakukan tatalaksana dengan *cauter coagulans*. Lalu luka diperdalam sampai ditemukan *os processus spinosus*. Kemudian operasi diperdalam sampai bertemu dengan lamina dan dilakukan laminektomi pada T10-T12. Dan akan ditemukan *Dura spinal cord* setelah lemak epidural ditemukan. Dan dilanjutkan dengan pembuatan model *spinal cord injury* (SCI) pada T11 dengan menggunakan *yasargil clip*. *Yasargil clip* dimasukkan dalam keadaan terbuka pada anterior dan posterior *Spinal cord* T11. Setelah masuk, pengait *Yasargil clip* dilepas. Pelepasan pengait *Yasargil clip* secara spontan akan membentuk model kompresi dan kontusio secara bersamaan dengan panjang 7 mm dan beban 65 g. Penjepitan ini dipertahankan selama 1 menit. Setelah 1 menit, *Yasargil clip* dilepaskan dan diberikan penanda dengan menjahit benang pada fascia otot yang selevel dengan model SCI.

Setelah pembuatan model SCI, dilakukan pencucian luka operasi menggunakan *normal saline* 10 ml menggunakan kapas. Setelah pencucian, dilakukan penutupan luka operasi dengan menjahit fascia otot paraspinal dan kulit, kemudian jahitan tersebut diberi serbuk (obat) pengering luka. Keberhasilan dari model SCI ini dilihat dari lumpuhnya dua tungkai belakang tikus dengan BBB score 0, retensi urin, dan retensi alvi sehingga menyebabkan perut kembung (Basso dkk., 1995; Kjell dan Olson, 2016; Ahmed dkk., 2019).

Setelah 3 hari pembentukan model SCI, kelompok perlakuan dilakukan injeksi sekretom NSC. Sekretom NSC diinjeksi dengan dosis 30 µl menggunakan spuit 50 µl secara intratekal (Cizkova dkk., 2018). Proses injeksi ini dipertahankan selama 30 detik agar cairan sekretom NSC tidak *reflux*.

Proses terminasi hewan uji dilakukan pada hari ke 28 dengan induksi anestesi inhalasi berupa eter. Eter tersebut diteteskan pada kapas dan

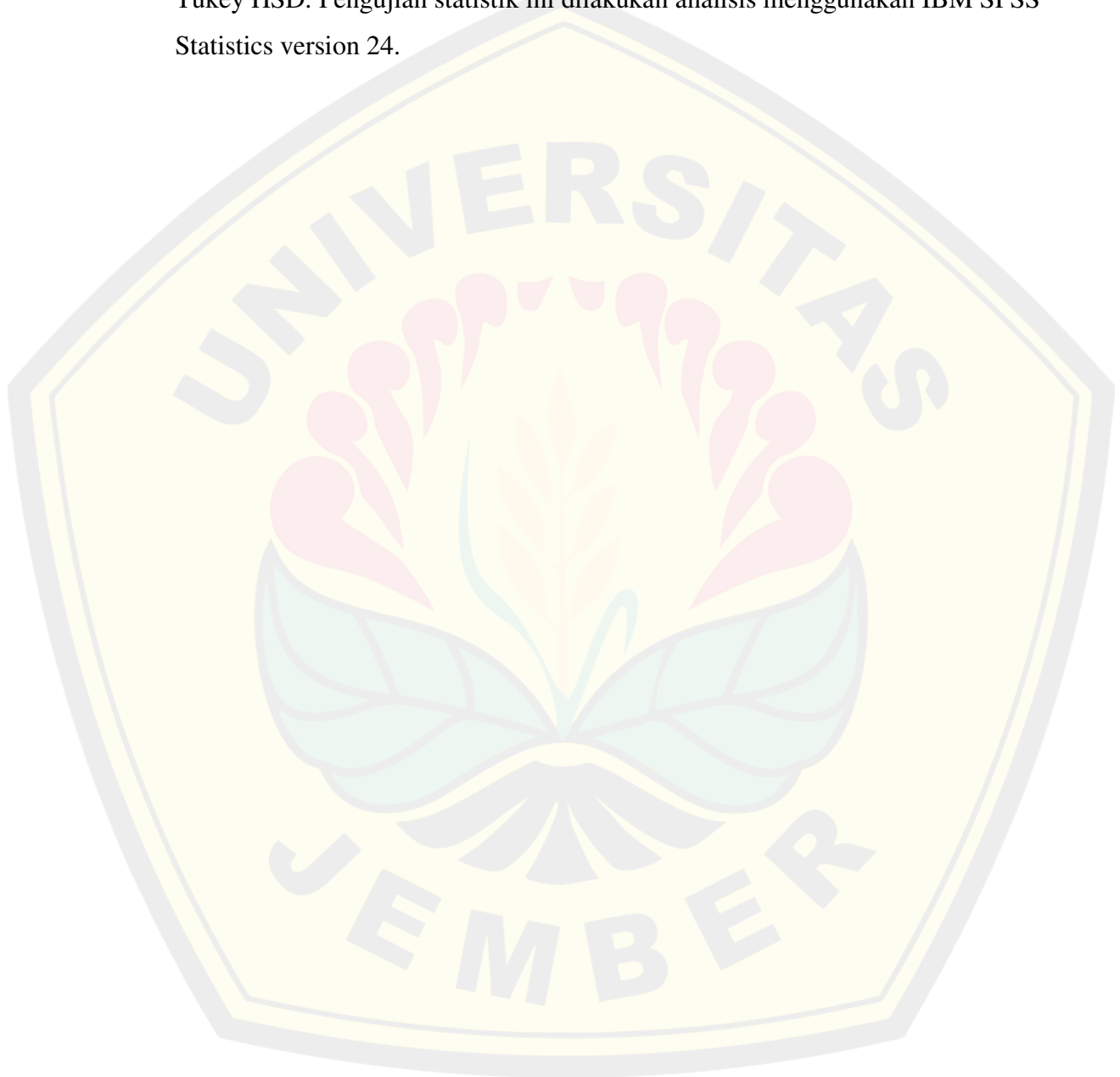
ditempatkan dalam wadah kaca tertutup bersama hewan uji. Selanjutnya diamati aktivitas hewan coba. Hewan uji mulai tidur, ditandai dengan berkurangnya aktivitas mata. Setelah hewan coba mati dan diambil sampel darah intrakardial, hewan coba dibakar terlebih dahulu kemudian dikuburkan sesuai dengan prosedur dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Proses selanjutnya adalah pemeriksaan F2-isoprostan menggunakan metode kompetitif Elisa. Pemeriksaan ini menggunakan ELISA Kit 8-epi-PGF2 α (8-Epi-Prostaglandin F2 Alpha) dari Elabscience[®]. Langkah awal yang dilakukan adalah pengenceran pada standar, blanko, dan sampel. Setelah pengenceran standar, blanko, dan sampel, ditambahkan 50 mL larutan *biotinylated detection Ab* ke setiap sumur. Kemudian *plate* ditutupi dengan *sealer* yang disediakan pada kit. Inkubasi selama 45 menit pada suhu 37°C. Setelah 45 menit, buang cairan lalu tambahkan 350 mL *buffer* pencuci pada setiap sumuran dan dibiarkan selama 1 menit lalu buang cairan tersebut dan keringkan dengan kertas penyerap. Lakukan pencucian tersebut sebanyak 3 kali. Setelah dilakukan pencucian, masukan 100 mL larutan kerja *HRP Conjugate* ke masing-masing sumuran, tutupi *plate* dengan *sealer* dan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Lalu lakukan pencucian sebanyak 5 kali. Kemudian tambahkan 90 mL *substrate reagent* pada setiap sumuran, tutupi *plate* dengan *sealer* dan inkubasi selama 15 menit pada suhu 37°C. Setelah 15 menit tambahkan 50 mL *stop solution* pada masing-masing sumuran. Setelah itu ditentukan kerapatan optik (*optical density*) menggunakan *microplate reader* dengan gelombang 450 nm. Setelah ditentukan kerapatan optik (*optical density*), dibuat kurva standar dari kerapatan yang telah ditentukan.

3.9 Teknik Penyajian dan Analisis data

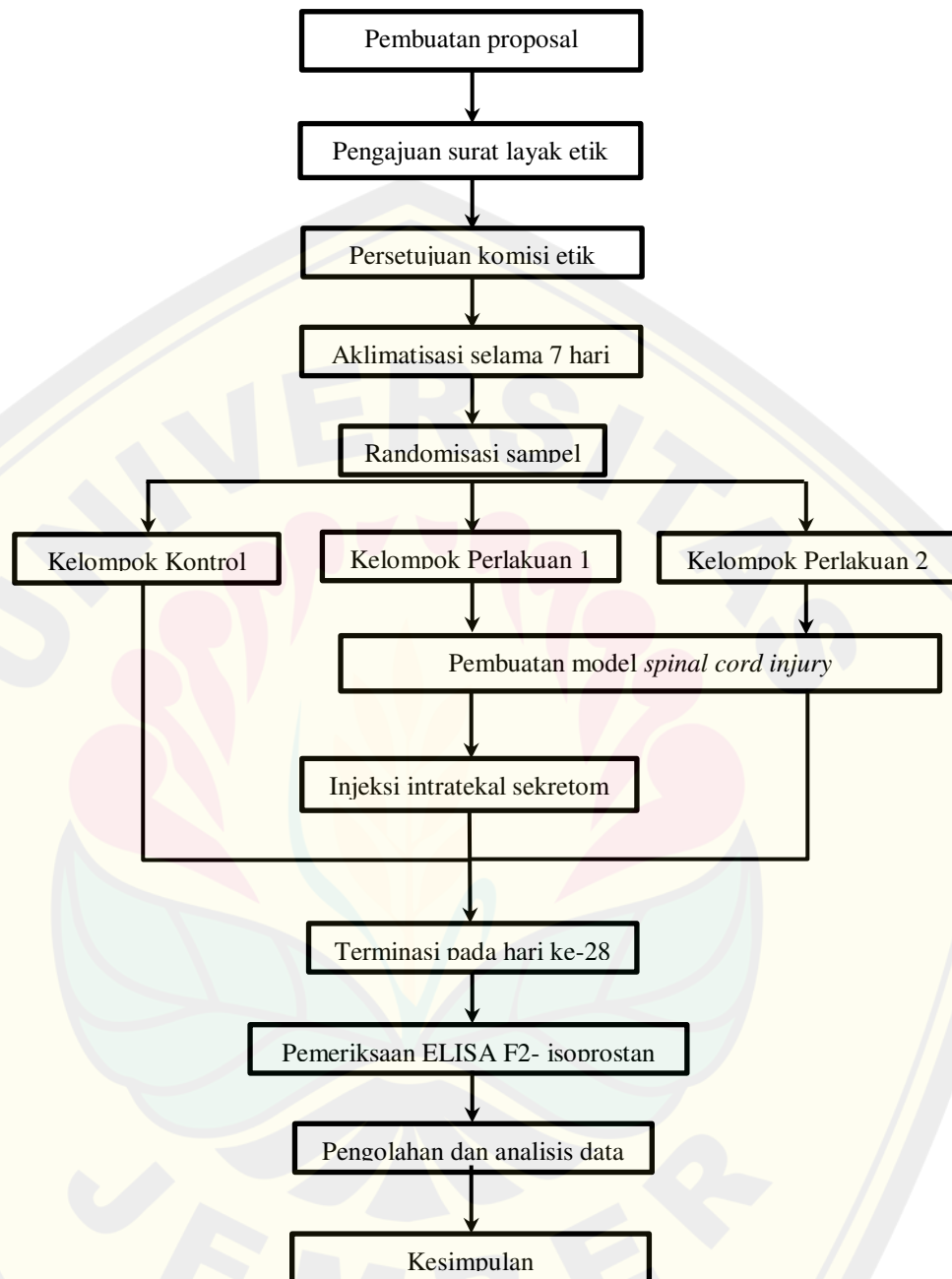
Penelitian ini, dilakukan uji normalitas, homogenitas dan analisis data multivariat. Uji normalitas yang digunakan adalah uji Shapiro-Wilk dikarenakan jumlah data kurang dari 50. Uji homogenitas yang digunakan

adalah uji Levene . Berdasarkan uji normalitas, data yang bersifat abnormal akan dilanjutkan menggunakan uji Kruskal-Wallis. Data yang bersifat normal; dan tidak homogen akan dilanjutkan dengan uji Welch dan dilanjutkan dengan uji post hoc berupa uji Gomes-Howell. Sedangkan, data yang bersifat normal dan homogen akan dilanjutkan dengan uji One-way ANOVA dan uji Post Hoc Tukey HSD. Pengujian statistik ini dilakukan analisis menggunakan IBM SPSS Statistics version 24.



3.10 Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1 berikut:



Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

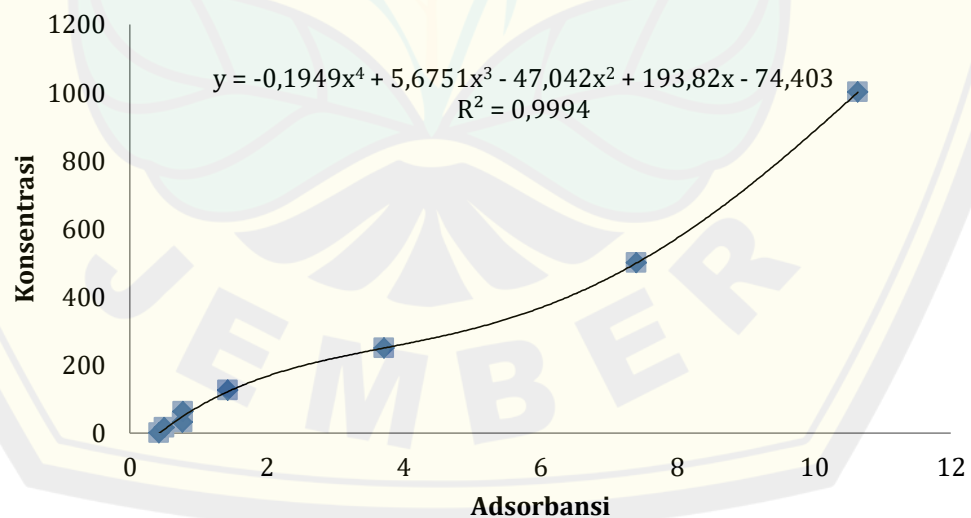
4.1 Hasil Penelitian

Nilai absorbansi standar pada pemeriksaan ELISA F2-isoprostan pada penelitian ini, dapat dilihat pada tabel 4.1 :

Tabel 4.1 Nilai absorbansi standar

| Standard | Konsentrasi | Absorbansi |
|----------|-------------|------------|
| 1 | 0 | 2,345 |
| 2 | 15,63 | 1,987 |
| 3 | 31,25 | 1,299 |
| 4 | 62,5 | 1,292 |
| 5 | 125 | 0,698 |
| 6 | 250 | 0,269 |
| 7 | 500 | 0,135 |
| 8 | 1000 | 0,094 |

Nilai absorbansi dan konsentrasi standar pada pemeriksaan ELISA F2-isoprostan, menghasilkan suatu kurva standar. kurva hubungan antara absorbansi dan konsentrasi larutan standar dapat dilihat pada gambar 4.1:



Gambar 4.1 Kurva hubungan antara absorbansi dan konsentrasi larutan standar F2-isoprostan

Berdasarkan grafik standar pada gambar 4.1 didapatkan R^2 sebesar 0,9994 dan didapatkan persamaan polinomial berupa $y = -0,1949x^4 + 5,6751x^3 - 47,042x^2 + 193,82x - 74,403$. Berdasarkan persamaan tersebut, didapatkan konsentrasi F2-isoprostan pada tabel 4.2 berikut:

Tabel 4.2 Nilai konsentrasi sampel

| No. | Sampel | Konsentrasi |
|-----|--------|-------------|
| 1. | N1 | 256,587 |
| 2. | N2 | 237,380 |
| 3. | N3 | 295,507 |
| 4. | N4 | 239,718 |
| 5. | N5 | 233,761 |
| 6. | A1 | 283,512 |
| 7. | A2 | 241,637 |
| 8. | A3 | 243,600 |
| 9. | A4 | 246,125 |
| 10. | A5 | 260,880 |
| 11. | B1 | 241,152 |
| 12. | B2 | 312,984 |
| 13. | B3 | 348,178 |
| 14. | B4 | 357,307 |
| 15. | B5 | 384,417 |

Setelah didapatkan konsentrasi pada sampel, dilakukan analisis. Rincian analisis deskriptif pada penelitian ini pada tabel 4.3 berikut:

Tabel 4.3 Analisis deskriptif

| | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | Minimum | Maximum |
|------------------|----|---------|----------------|------------|---------|---------|
| Normal | 5 | 252,591 | 25,541 | 11,422 | 233,8 | 295,5 |
| SCI-sekretom | 5 | 255,151 | 17,569 | 7,857 | 241,6 | 283,5 |
| SCI-Non sekretom | 5 | 328,808 | 55,257 | 24,71 | 241,2 | 384,4 |
| Total | 15 | 278,850 | 49,851 | 12,871 | 233,8 | 384,4 |

Setelah didapatkan analisis, dilakukan analisis statistik menggunakan *One Way ANOVA*. Sebelum dilakukan komparasi, dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk Test* Berikut adalah rincian hasil dari uji normalitas pada tabel 4.4 berikut:

Tabel 4.4 Uji Normalitas

| Perlakuan | <i>Shapiro-Wilk</i> | | |
|------------------|---------------------|-----------|-------------|
| | <i>Statistic</i> | <i>Df</i> | <i>Sig.</i> |
| Normal | 0,799 | 5 | 0,080 |
| SCI-sekretom | 0,829 | 5 | 0,138 |
| SCI-Non sekretom | 0,919 | 5 | 0,520 |

Hasil dari uji normalitas, didapatkan signifikansi pada tiap variabel $>0,05$. Oleh karena itu H_0 diterima yaitu, semua variabel berdistribusi normal. setelah itu dilakukan uji homogenitas *Levene Test*. Berikut adalah tabel 4.5 mengenai hasil uji homogenitas:

Tabel 4.5 Uji Homogenitas

| <i>Levene Statistic</i> | <i>df1</i> | <i>df2</i> | <i>Sig.</i> |
|-------------------------|------------|------------|-------------|
| 2,726 | 2 | 12 | 0,106 |

Berdasarkan tabel 4.3 didapatkan signifikansi 0,067. Dikarenakan nilai signifikansi $>0,05$ maka data bersifat homogen.. Terpenuhinya syarat untuk melakukan uji *One Way ANOVA*, maka dilanjutkan uji *One Way ANOVA* dengan hasil seperti pada tabel 4.6 berikut:

Tabel 4.6 Uji *One Way ANOVA*

| | <i>Sum of Squares</i> | <i>Df</i> | <i>Mean Square</i> | <i>F</i> | <i>Sig.</i> |
|----------------|-----------------------|-----------|--------------------|----------|-------------|
| Between Groups | 18734,850 | 2 | 9367,425 | 7,000 | 0,010 |
| Within Groups | 16057,823 | 12 | 1338,152 | | |
| Total | 34792,673 | 14 | | | |

Uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi $<0,05$. Berdasarkan nilai tersebut maka H_1 diterima, yaitu setiap variabel memiliki beda nyata. Cara mengetahui variabel apa yang memiliki perbedaan paling menonjol, maka dilakukan uji *Post Hoc Tukey HSD*. Berikut adalah hasil dari uji *Post Hoc* pada tabel 4.7 berikut:

Tabel 4.7 Uji *Post Hoc* Tukey HSD

| (I) perlakuan | (J) perlakuan | <i>Mean Difference (I-J)</i> | <i>Std. Error</i> | <i>Sig.</i> | <i>95% Confidence Interval</i> | |
|---------------------|---------------------|--------------------------------------|-----------------------|-------------|------------------------------------|------------------------|
| | | | | | <i>Lower Bound</i> | <i>Upper Bound</i> |
| Normal | SCI- sekretom | -2,5602 | 23,1357 | 0,993 | -64,283 | 59,163 |
| | SCI-Non sekretom | -76,2170 | 23,1357 | 0,016 | -137,940 | -14,494 |
| SCI- sekretom | normal | 2,5602 | 23,1357 | 0,993 | -59,163 | 64,283 |
| | SCI-Non sekretom | -73,6568 | 23,1357 | 0,020 | -135,380 | -11,934 |
| SCI-Non sekretom | normal | 76,2170 | 23,1357 | 0,016 | 14,494 | 137,940 |
| | SCI- sekretom | 73,6568 | 23,1357 | 0,020 | 11,934 | 135,380 |

Berdasarkan uji *Post Hoc*, perbedaan paling signifikan adalah kelompok SCI- non sekretom. Perbedaan rerata kelompok SCI- non sekretom dan kelompok normal adalah 76,2170. Lalu perbedaan kelompok SCI- non sekretom dan kelompok SCI yang diinjeksi sekretom adalah 73,6568. Sedangkan kelompok kontrol dan kelompok SCI yang diinjeksi sekretom tidak memiliki perbedaan yang signifikan.

4.2 Pembahasan

Hasil yang didapatkan pada penelitian ini adalah, injeksi intratekal sekretom NSC dapat menurunkan kadar plasma F2-isoprostan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain *Sprague dawley* dengan SCI sub-akut model kontusio-kompresi. Hal ini dapat dilihat dari perbandingan kelompok SCI yang diinjeksi intratekal sekretom NSC dan kelompok SCI yang tidak diinjeksi sekretom NSC yang menunjukkan perbedaan yang nyata (sig. 0,02). Selain perbandingan tersebut, perbandingan kelompok normal dan kelompok SCI yang diinjeksi intratekal sekretom NSC tidak menunjukkan perbedaan (sig. 0,993).

Spinal cord injury model kontusio-kompresi pada hewan mirip dengan beberapa karakteristik yang relevan pada TSCI di manusia. Hal ini dikarenakan, kedua model ini dapat mempelajari mekanisme SCI pada fase cedera sekunder. Selain itu, model kompresi dapat sangat berguna untuk mempelajari terapi transplantasi sel pada SCI (Ahmed dkk., 2019). Intervensi pengobatan pada fase sub-akut dapat mencegah komplikasi, mempromosikan dan meningkatkan pemulihan saraf, memaksimalkan fungsi saraf, dan membangun kondisi optimal untuk pemeliharaan kesehatan dan fungsi saraf pada jangka panjang. Pengecekan lanjutan perlu dilakukan untuk mengetahui keberhasilan dari intervensi tersebut (Burns dkk., 2017).

Peningkatan F2-isoprostan pada kelompok SCI yang tidak diinjeksi intratekal sekretom NSC sesuai dengan penelitian Basu dkk. (2001) dan Bastani dkk. (2012). Pada penelitian Basu dkk. (2001) didapatkan babi yang mengalami SCI dengan iskemik terdapat peningkatan F2-isoprostan. Dan pada penelitian Bastani dkk. (2012), didapatkan peningkatan F2-isoprostan pada manusia dengan SCI pada 1 bulan pasca SCI dibandingkan dengan kontrol.

Spinal cord adalah organ saraf pusat (Mader dan Windelspecht, 2012). Saraf pada sistem saraf pusat, kaya akan *polyunsaturated fatty acids* seperti *arachidonic* (Falomir-Lockhart dkk., 2019). Stimulasi pensinyalan ARA oleh neuroreseptor glutamat, serotonin, asetilkolin atau dopamin memicu pelepasan ARA oleh PLA2 (Akhlq A. Farooqui, 2014). Pada SCI, terjadi upregulasi dan/atau stimulasi berlebihan dari reseptor membran terkait PLA2 (Toborek dkk., 2002).

Peroxyl radical adalah isomer dari ARA. Pembentukan F2-isoprostan melibatkan *peroxyl radical* yang mengalami siklisasi 5-exo dan penambahan molekul oksigen sehingga membentuk *endoperoxide* berupa prostaglandin-G2 (PGG2). Prostaglandin-G2 akan mengalami *rearrangement* dan reduksi oleh endoperoksidase seluler kemudian akan menjadi F2-isoprostan. F2-isoprostan kemudian dilepaskan dalam bentuk bebas oleh PLA2 (Akhlq A. Farooqui, 2014).

Penurunan F2-isoprostan pada kelompok SCI yang diinjeksi intratekal sekretom NSC sesuai dengan pernyataan Dos Santos dkk. (2021) bahwa sekretom NSC memiliki peran antioksidan yang penting. Faktor neurotropik yang terdapat pada NSC bertindak dalam pertahanan seluler antioksidan. Pertahanan seluler antioksidan dilakukan dengan meningkatkan jumlah dan aktivitas enzim antioksidan dan bekerja pada mitokondria dengan meningkatkan fungsinya atau mencegah kerusakannya.

Brain-derived neurotrophic factor adalah salah satu neurotropik faktor (Wang dkk., 2017). *Brain-derived neurotrophic factor* akan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSSG-R), Sulfiredoxin (Srx), dan Sestrin2 (SESN2). Peningkatan aktivitas antioksidan ini akan mengurangi ROS. Selain meningkatkan enzim antioksidan, BDNF dapat meningkatkan *mitochondrial uncoupling protein 2* (UCP2). Peningkatan UCP2, akan mengembalikan kapasitas kopling elektron mitokondria seperti pada kondisi semula. Pengembalian kapasitas kopling elektron mitokondria tersebut akan menginduksi akumulasi *phosphorylated cAMP response element* (pCREB) pada matriks dan membran dalam mitokondria sehingga akan membantu sintesis pada kompleks V mitokondria (Dos Santos dkk., 2021).

Selain faktor neurotropik, sekretom NSC mengandung sitokin yang dapat menurunkan stres oksidatif melalui aktivitas antiinflamasi. Sitokin IL-4, IL-10 dan TGF- β dapat menginduksi polarisasi makrofag menuju M2 makrofag (Li dkk., 2022). Hal ini diperkuat dengan penelitian Ji dkk. (2020) NSC mensekresi IL-4 yang menginduksi polarisasi M2 makrofag dengan mereduksi aktivasi jalur NF- κ B/p53 untuk mencegah polarisasi M1 makrofag ketika diferensiasi saraf, M2 makrofag berpotensi sebagai terapi pada SCI. M1 makrofag berperan sebagai proinflamasi yang akan menginduksi sitokin IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 dan IL-23, TNF- α , dan IFN- γ ; kemokin CCL2 dan CXCL1; serta ROS berupa *superoxide* dan *nitric oxide*; sedangkan M2 makrofag berperan sebagai antiinflamasi akan menginduksi sitokin IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , dan faktor pertumbuhan BDNF, *insulin-like growth factor* (IGF), *nerve*

growth factor NGF, *ciliary neurotrophic factor* (CNF), *epidermal growth factor* (EGF) (Anwar dkk., 2016; Atri dkk., 2018).

Interleukin-10 yang diinduksi M2 makrofag, akan menginduksi polarisasi A2 astrosit (Liu dkk., 2020). Selain IL-10, TGF- β yang diinduksi M2 makrofag berperan untuk menginduksi polarisasi A1 astrosit menjadi non-reaktif astrosit (Baldwin dan Eroglu, 2017). A1 Astrosit dapat mengeluarkan neurotoksin yang menginduksi kematian secara cepat pada neuron dan oligodendrosit. Sedangkan A2 astrosit berperan dalam meningkatkan kelangsungan hidup neuron dan perbaikan jaringan sehingga akan terjadi peningkatan metabolisme energi mitokondria, penurunan faktor proinflamasi, dan peningkatan faktor neuroprotektif seperti faktor neurotropik yang diturunkan dari otak dan faktor neurotropik yang diturunkan dari sel glial (Li dkk., 2019; Li dkk., 2020).

Pada penelitian ini, dihasilkan penurunan F2-isoprostan pada kelompok yang mendapatkan injeksi intratekal sekretom NSC dan terbatas pada mengetahui efek pemberian sekretom NSC pada SCI sub-akut. Penelitian ini tidak meneliti patomekanisme yang spesifik sehingga belum diketahui faktor proinflamasi utama yang menyebabkan peningkatan F2-isoprostan. Selain hal tersebut, peneliti masih menggunakan sekretom NSC yang belum selektif mengandung antiinflamasi dan neurotropik tertentu sehingga belum diketahui kandungan utama yang menyebabkan penurunan F2-isoprostan. Berdasarkan kekurangan dan limitasi tersebut maka peneliti menyarankan untuk melakukan penelitian lanjutan terkait dengan penggunaan sekretom NSC yang dimodifikasi mengandung salah satu dari sitokin antiinflamasi yaitu IL-10, IL-4 dan TGF- β sehingga dapat diketahui kandungan utama sekretom yang menyebabkan penurunan F2-isoprostan. Selain itu, disarankan untuk meneliti mengenai patomekanisme terkait dengan proinflamasi yang menyebabkan peningkatan F2-isoprostan seperti sitokin proinflamasi IL-1 β , IL-6, dan TNF- α ; serta glutamat, sehingga dapat mengetahui faktor proinflamasi utama yang menyebabkan peningkatan F2-isoprostan.

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Injeksi intratekal sekretom NSC dapat menurunkan kadar plasma F2-isoprostan pada tikus dengan SCI sub-akut model kontusio-kompresi.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan oleh peneliti dari penelitian yang telah dilakukan adalah diperlukan penelitian lanjutan terkait, yaitu:

- a. Uji parameter inflamasi pada sitokin proinflamasi IL-1 β , IL-6, dan TNF- α ; serta glutamat.
- b. Penggunaan sekretom NSC yang spesifik mengandung salah satu dari sitokin antiinflamasi yaitu IL-10, IL-4 dan TGF- β .

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, R. U., M. Alam, dan Y. P. Zheng. 2019. Experimental spinal cord injury and behavioral tests in laboratory rats. *Heliyon*. 5(3):e01324.
- Ahuja, C. S., A. Mothe, M. Khazaei, J. H. Badhiwala, E. A. Gilbert, D. Van Der Kooy, C. M. Morshead, C. Tator, dan M. G. Fehlings. 2020. The leading edge: emerging neuroprotective and neuroregenerative cell-based therapies for spinal cord injury. *Stem Cells Translational Medicine*. 9:1509–1530.
- Akhlaq A. Farooqui. 2014. *Inflammation and Oxidative Stress in Neurological Disorders Effect of Lifestyle, Genes, and Age*. Columbus: Springer International Publishing Switzerland.
- Anjum, A., M. Da'in Yazid, M. Fauzi Daud, J. Idris, A. Min, H. Ng, A. S. Naicker, O. Htwe, R. Ismail, R. Kumar, A. Kumar, dan Y. Lokanathan. 2020. Molecular sciences spinal cord injury: pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 21:1–35.
- Anwar, M. A., T. S. Al Shehabi, dan A. H. Eid. 2016. Inflammogenesis of secondary spinal cord injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 10(APR):1–24.
- Atri, C., F. Z. Guerfali, dan D. Laouini. 2018. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(6)
- Baldwin, K. T. dan C. Eroglu. 2017. Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*. 45:113–120.
- Basso, D. M., M. S. Beattie, dan J. C. Bresnahan. 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of Neurotrauma*. 12(1):1–21.
- Bastani, N. E., E. Kostovski, A. K. Sakhi, A. Karlsen, M. H. Carlsen, N. Hjeltnes, R. Blomhoff, dan P. O. Iversen. 2012. Reduced antioxidant defense and increased oxidative stress in spinal cord injured patients. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 93(12):2223-2228.e2.
- Basu, S. 2007. The enigma of in vivo oxidative stress assessment: isoprostanes as an emerging target. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*. 51(2):48–61.

- Basu, S., A. Hellberg, A. T. Ulus, J. Westman, dan S. Karacagil. 2001. Biomarkers of Free Radical Injury during Spinal Cord Ischemia. *FEBS Letters*. 2001.
- Basu, S., A. Nozari, X. L. Liu, S. Rubertsson, dan L. Wiklund. 2000. Development of a novel biomarker of free radical damage in reperfusion injury after cardiac arrest. *FEBS Letters*. 470(1):1–6.
- Bauer, J., A. Ripperger, S. Frantz, S. Ergün, E. Schwedhelm, dan R. A. Benndorf. 2014. Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane a₂ receptor activation. *British Journal of Pharmacology*. 171(13):3115–3131.
- Burns, A. S., R. J. Marino, S. Kalsi-Ryan, J. W. Middleton, L. A. Tetreault, J. R. Dettori, K. E. Mihalovich, dan M. G. Fehlings. 2017. Type and timing of rehabilitation following acute and subacute spinal cord injury: a systematic review. *Global Spine Journal*. 7(3_supplement):175S-194S.
- Charan, J. dan N. Kantharia. 2013. How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 4(4):303–306.
- Chen, Y., H. Zhong, Y. Zhao, X. Luo, dan W. Gao. 2020. Role of platelet biomarkers in inflammatory response. *Biomarker Research*. 8(1):2–8.
- Cizkova, D., V. Cubinkova, T. Smolek, A. Murgoci, J. Danko, K. Vdoviakova, F. Humenik, M. Cizek, J. Quanico, I. Fournier, dan M. S. Id. 2018. Localized intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells conditioned medium improves functional recovery in a rat model of spinal cord injury. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(3):1–13.
- Clayton, D. B., H. A. Stephany, C. B. Ching, S. A. Rahman, S. T. Tanaka, J. C. Thomas, J. C. Pope, M. C. Adams, J. W. Brock, P. E. Clark, S. W. Hayward, R. J. Matusik, dan G. L. Milne. 2014. F₂-isoprostanes as a biomarker of oxidative stress in the mouse bladder. *Journal of Urology*. 191(5 SUPPL):1597–1601.
- Collin, F. 2019. Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(10)
- Cripps, R. A., B. B. Lee, P. Wing, E. Weerts, J. MacKay, dan D. Brown. 2011. A Global Map for Traumatic Spinal Cord Injury Epidemiology: Towards a Living Data Repository for Injury Prevention. *Spinal Cord*. 2011.
- Di Stefano, A., T. Coccini, E. Roda, C. Signorini, B. Balbi, G. Brunetti, dan P. Ceriana. 2018. Blood mcp-1 levels are increased in chronic obstructive

pulmonary disease patients with prevalent emphysema. *International Journal of COPD*. 13:1691–1700.

Dos Santos, M. F., C. Roxo, dan S. Solá. 2021. Oxidative-signaling in neural stem cell-mediated plasticity: implications for neurodegenerative diseases. *Antioxidants*. 10(7)

Driscoll, J. dan T. Patel. 2019. The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease. *Journal of Gastroenterology*. 54(9):763–773.

Falomir-Lockhart, L. J., G. F. Cavazzutti, E. Giménez, dan A. M. Toscani. 2019. Fatty acid signaling mechanisms in neural cells: fatty acid receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 13(April):1–24.

Fan, B., Z. Wei, X. Yao, G. Shi, X. Cheng, X. Zhou, H. Zhou, dan G. Ning. 2018. Microenvironment imbalance of spinal cord injury. 27(6):853–866.

Fehlings, M. G., L. A. Tetreault, J. R. Wilson, B. K. Kwon, A. S. Burns, A. R. Martin, G. Hawryluk, dan J. S. Harrop. 2017. A Clinical Practice Guideline for the Management of Acute Spinal Cord Injury: Introduction, Rationale, and Scope. *Global Spine Journal*. 2017.

Foo, J. B., Q. H. Looi, P. P. Chong, N. H. Hassan, G. E. C. Yeo, C. Y. Ng, B. Koh, C. W. How, S. H. Lee, dan J. X. Law. 2021. Comparing the therapeutic potential of stem cells and their secretory products in regenerative medicine. *Stem Cells International*. 2021

Galeiras Vázquez, R., M. E. Ferreiro Velasco, M. Mourelo Fariña, A. Montoto Marqués, dan S. Salvador de la Barrera. 2017. Update on traumatic acute spinal cord injury. part 1. *Medicina Intensiva (English Edition)*. 41(4):237–247.

Gao, L., W. Xu, T. Li, J. Chen, A. Shao, F. Yan, dan G. Chen. 2018. Stem cell therapy: a promising therapeutic method for intracerebral hemorrhage. *Cell Transplantation*. 27(12):1809–1824.

Hall, J. dan M. Hall. 2020. *Guyton And Hall Textbook of Medical Physiology*. Edisi 14th. Philadelphia: Elsevier.

Hartline, R. H. C. L. 2021. *Human Anatomy Laboratory Manual*. California: UC Davis Library. 5555. *Nature*.

James, S. L., M. S. Bannick, W. C. Montjoy-Venning, dan E. Al. 2019. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016.

The Lancet Neurology. 18(1):56–87.

Jeusette, I., A. Salas, dan N. Iraculis. 2009. Increased urinary f2isoprostane concentration as an indicator of oxidative stress in overweight cats. *Int J App Res Vet Med*. 7:36–42.

Ji, Z., X. Jiang, Y. Li, J. Song, C. Chai, dan X. Lu. 2020. Neural Stem Cells Induce M2 Polarization of Macrophages through the Upregulation of Interleukin-4. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2020.

Jia, Z., H. Zhu, J. Li, X. Wang, H. Misra, dan Y. Li. 2012. Oxidative stress in spinal cord injury and antioxidant-based intervention. *Spinal Cord*. 50(4):264–274.

Kalluri, R. dan V. S. LeBleu. 2020. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 367(6478)

Katoh, H., K. Yokota, dan M. G. Fehlings. 2019. Regeneration of spinal cord connectivity through stem cell transplantation and biomaterial scaffolds. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 13:248.

Kjell, J. dan L. Olson. 2016. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. 9:1125–1137.

Kolios, G. dan Y. Moodley. 2013. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 85(1):3–10.

Konermann, S. 2019. Oxidative stress biomarkers of brain damage: hyperacute plasma f2-isoprostane predicts infarct growth in stroke. *Physiology & Behavior*. 173(3)(1):665–676.

Kumar Praveen J dan Clark Michael L. 2020. Kumar and clark's clinical medicine - 10th edition. *Elsevier*. 10:407–410.

Lee, B. B., R. A. Cripps, M. Fitzharris, dan P. C. Wing. 2014. The Global Map for Traumatic Spinal Cord Injury Epidemiology: Update 2011, Global Incidence Rate. *Spinal Cord*. 2014.

Lee, V. M., S. Scientist, S. A. Louis, dan B. A. Reynolds. 2015. Neural stem cells identification of neural stem cells the function of neural stem cells in vivo. *Stem Cell Technologies*. 5:1–6.

Li, T., X. Chen, C. Zhang, Y. Zhang, dan W. Yao. 2019. An update on reactive astrocytes in chronic pain. 1–14.

Li, T., T. Liu, X. Chen, L. Li, M. Feng, Y. Zhang, L. Wan, dan C. Zhang. 2020.

Microglia induce the transformation of $\alpha 1 / \alpha 2$ reactive astrocytes via the *cxcr7 / pi3k / akt* pathway in chronic post-surgical pain. 1–15.

Li, X., Y. Guan, C. Li, T. Zhang, F. Meng, J. Zhang, J. Li, S. Chen, Q. Wang, Y. Wang, J. Peng, dan J. Tang. 2022. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in peripheral nerve injury. *Stem Cell Research and Therapy*. 13(1):1–13.

Liau, L. L., Q. H. Looi, W. C. Chia, T. Subramaniam, M. H. Ng, dan J. X. Law. 2020. Treatment of spinal cord injury with mesenchymal stem cells. *Cell and Bioscience*. 10(1):1–17.

Ligor, M. dan P. Olszowy. 2012. Application of medical and analytical methods in lyme borreliosis monitoring. 2233–2248.

Liu, L. R., J. C. Liu, J. S. Bao, Q. Q. Bai, dan G. Q. Wang. 2020. Interaction of microglia and astrocytes in the neurovascular unit. *Frontiers in Immunology*. 11(July):1–11.

Mader, S. S. dan M. Windelspecht. 2012. *Human Biology*. Edisi 12. New York: McGraw-Hill Medical.

Mayer, J. dan U. Human. 2001. Elevated plasma f2-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. 59:1960–1966.

Maynard, R. L. dan N. Downes. 2019. *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*. Edisi 1. Chennai, India: Andre Gerhard Wolf. *Academic Press*.

Meiliana, A., N. M. Dewi, dan A. Wijaya. 2019. Mesenchymal stem cell secretome: cell-free therapeutic strategy in regenerative medicine. *Indonesian Biomedical Journal*. 11(2):113–124.

Milne, G. L., H. Yin, dan J. D. Morrow. 2008. Human biochemistry of the isoprostane pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 283(23):15533–15537.

Mohammed, I., S. Ijaz, T. Mokhtari, M. Gholaminejhad, M. Mahdavi-pour, B. Jameie, M. Akbari, dan G. Hassanzadeh. 2020. Subventricular zone-derived extracellular vesicles promote functional recovery in rat model of spinal cord injury by inhibition of nlrp3 inflammasome complex formation. *Metabolic Brain Disease*. 35(5):809–818.

Morel, A., L. Saso, dan J. Saluk. 2014. Isoprostanes and neuroprostanes as biomarkers of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014:10.

- Mourelo Fariña, M., S. Salvador de la Barrera, A. Montoto Marqués, M. E. Ferreiro Velasco, dan R. Galeiras Vázquez. 2017. Update on traumatic acute spinal cord injury. part 2. *Medicina Intensiva (English Edition)*. 41(5):306–315.
- Musiek, E. S., H. Yin, G. L. Milne, dan J. D. Morrow. 2005. Recent advances in the biochemistry and clinical relevance of the isoprostane pathway. 987–994.
- National Spinal Cord Injury Statistical Center. 2020. *The 2020 Annual Statistical Report Complete Public Version For The Spinal Cord Injury Model Systems*. Birmingham, Alabama
- Peterson, M. D., N. Kamdar, A. Chiodo, dan D. G. Tate. 2020. Psychological morbidity and chronic disease among adults with traumatic spinal cord injuries: a longitudinal cohort study of privately insured beneficiaries. *Mayo Clinic Proceedings*. 95(5):920–928.
- Putman, A. K., G. Andres Contreras, dan L. M. Sordillo. 2021. Isoprostanes in veterinary medicine: beyond a biomarker. *Antioxidants*. 10(2):1–16.
- Ray, S. K. 2020. Modulation of autophagy for neuroprotection and functional recovery in traumatic spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*. 15(9):1601–1612.
- Roberts, L. J. dan J. F. Reckelhoff. 2001. Measurement of f2-isoprostanes unveils profound oxidative stress in aged rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 287(1):254–256.
- Rong, Y., W. Liu, J. Wang, J. Fan, Y. Luo, L. Li, F. Kong, J. Chen, P. Tang, dan W. Cai. 2019. Neural Stem Cell-Derived Small Extracellular Vesicles Attenuate Apoptosis and Neuroinflammation after Traumatic Spinal Cord Injury by Activating Autophagy. *Cell Death and Disease*. 2019.
- Salwierak-Głońska, K., P. Piątek, M. Domowicz, dan M. Świderek-Matysiak. 2022. Effect of multiple sclerosis cerebrospinal fluid and oligodendroglia cell line environment on human wharton's jelly mesenchymal stem cells secretome. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(4)
- Sastroasmoro, S. dan S. Ismael. 2011. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Edisi 4. Jakarta: Sagung Seto.
- Sherwood, L. 2013. *Introduction to Human Physiology*. Edisi 8. Cengage Learning. *Cengage Learning*.
- Siregar, O. 2012. Karakteristik dari penderita cedera medula spinalis traumatik di rsup haji adam malik medan periode januari 2009 – desember 2010. *Majalah*

Kedokteran Nusantara. 45:101–104.

Spittle, M. A., N. A. Hoenich, G. J. Handelman, R. Adhikarla, P. Homel, dan N. W. Levin. 2001. Oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases*. 38(6):1408–1413.

Splittgerber, R. S. 2019. *SNELL'S Clinical Neuroanatomy*. Edisi 8. Philadelphia. *Wolters Kluwer*.

Tchvaloon, E., L. Front, I. Gelernter, J. Ronen, V. Bluvshstein, dan A. Catz. 2008. Survival, Neurological Recovery and Morbidity after Spinal Cord Injuries Following Road Accidents in Israel. *Spinal Cord*. 2008.

Toborek, M., A. Malecki, R. Garrido, M. P. Mattson, B. Hennig, dan B. Young. 2002. Arachidonic acid-induced oxidative injury to cultured spinal cord neurons. *Journal of Neurochemistry*. 73(2):684–692.

Treuting, P. M., S. M. Dintzis, dan K. S. Montine. 2018. *Comparative Anatomy And Histology A Mouse, Rat, And Human Atlas*. Edisi second. Chennai, India: Mica Haley. *Academic Press*.

Vizioso, F., N. Eiro, S. Cid, J. Schneider, dan R. Perez-Fernandez. 2017. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(9):1852.

Wang, C., C. F. Lu, J. Peng, C. D. Hu, dan Y. Wang. 2017. Roles of neural stem cells in the repair of peripheral nerve injury. *Neural Regeneration Research*. 12(12):2106–2112.

Willis, C. M., A. M. Nicaise, R. Hamel, V. Pappa, L. Peruzzotti-Jametti, dan S. Pluchino. 2020. Harnessing the neural stem cell secretome for regenerative neuroimmunology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 14(November):1–14.

Woolcock, A. D., A. Cheney, P. Deshuillers, D. Knapp, dan G. E. Moore. 2020a. Veterinary internal medicine - 2020 - woolcock - assessment of urinary 15-f₂-isoprostanes in dogs with urothelial carcinoma.pdf. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 34:2454–2459.

Woolcock, A. D., A. Leisering, P. Deshuillers, J. Roque-torres, dan G. E. Moore. 2020b. Feline urinary f₂-isoprostanes measured by enzyme-linked immunoassay and gas chromatography – mass spectroscopy are poorly correlated. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 32(5):648–655.

World Health Organization dan ISCS. 2013. *International Perspectives on Spinal Cord Injury Care*. Edisi 1. Malta: WHO Library Cataloguing. *Spinal Cord*

Medicine.

Xia, J., S. Minamino, K. Kuwabara, dan S. Arai. 2019. Stem cell secretome as a new booster for regenerative medicine. *BioScience Trends*. 13(4):299–307.

Zhang, Q., J. Li, W. An, Y. Fan, dan Q. Cao. 2020. Neural stem cell secretome and its role in the treatment of neurodegenerative disorders. *Journal of Integrative Neuroscience*. 19(1):179–185.

Zivkovic, S., M. Ayazi, G. Hammel, dan Y. Ren. 2021. For better or for worse: a look into neutrophils in traumatic spinal cord injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 15(April):1–10.



LAMPIRAN

Lampiran 1. SOP Operasi

1. Hewan coba dibius dengan *acepromazine* 2 ml/KgBB dan ketamin dengan dosis 40 ml/KgBB.
2. Setelah hewan tidak sadar, hewan coba diletakkan pada papan fiksasi dengan posisi pronasi. Setelah itu dicukur rambut pada bagian punggung sekitar Thorakal 10-Thorakal 12.
3. Setelah rambut tercukur, dilakukan desinfeksi pada bagian operasi dengan betadine 10% dan alkohol 75%. Lalu daerah operasi ditutup kain steril dan dilakukan identifikasi Thorakal 12 (T12) dengan meraba *costae 12*.
4. Setelah teridentifikasi dilakukan insisi kulit sepanjang 4 cm. Hewan coba yang mengalami perdarahan dilakukan tatalaksana dengan *cauter coagulans*.
5. Lalu diperdalam sampai ditemukan *os processus spinosus*. Kemudian operasi diperdalam sampai bertemu dengan lamina dan dilakukan laminektomi pada T10-T12. Dan akan ditemukan *Dura spinal cord* setelah lemak epidural ditemukan.
6. Dilanjutkan dengan pembuatan model *spinal cord injury* (SCI) pada T11 dengan menggunakan *yasargil clip*. *Yasargil clip* dimasukan dalam keadaan terbuka pada anterior dan posterior *Spinal cord* T11. Setelah masuk, pengait *Yasargil clip* dilepas. Pelepasan pengait *Yasargil clip* secara spontan melakukan model kompresi dan kontusio secara bersamaan dengan beban 65 g, panjang 7 mm dengan gaya tekan 150 kDyne. Penjepitan ini dipertahankan selama 1 menit. Setelah 1 menit, *Yasargil clip* dilepaskan dan diberikan penanda dengan menjahit benang pada fascia otot yang selevel dengan model SCI.
7. Kemudian, dilakukan pencucian luka operasi menggunakan *normal saline* 10 ml menggunakan kapas. Setelah pencucian, dilakukan penutupan luka operasi dengan menjahit fascia otot paraspinal dan kulit. kemudian jahitan tersebut diberi serbuk (obat) pengering luka.
8. Keberhasilan dari model SCI ini dilihat dari lumpuhnya dua tungkai belakang tikus dengan BBB score 0, retensi urin, dan retensi alvi sehingga menyebabkan perut kembung (Basso dkk., 1995; Kjell dan Olson, 2016; Ahmed dkk., 2019).

Lampiran 2. SOP Injeksi Intratekal Sekretom

Sekretom yang digunakan adalah *Human Neurogenic Metabolite* dari Instalasi Bank Jaringan dan Sel RSUD DR. Soetomo Surabaya. Cara pemberian dilakukan sebagai berikut:

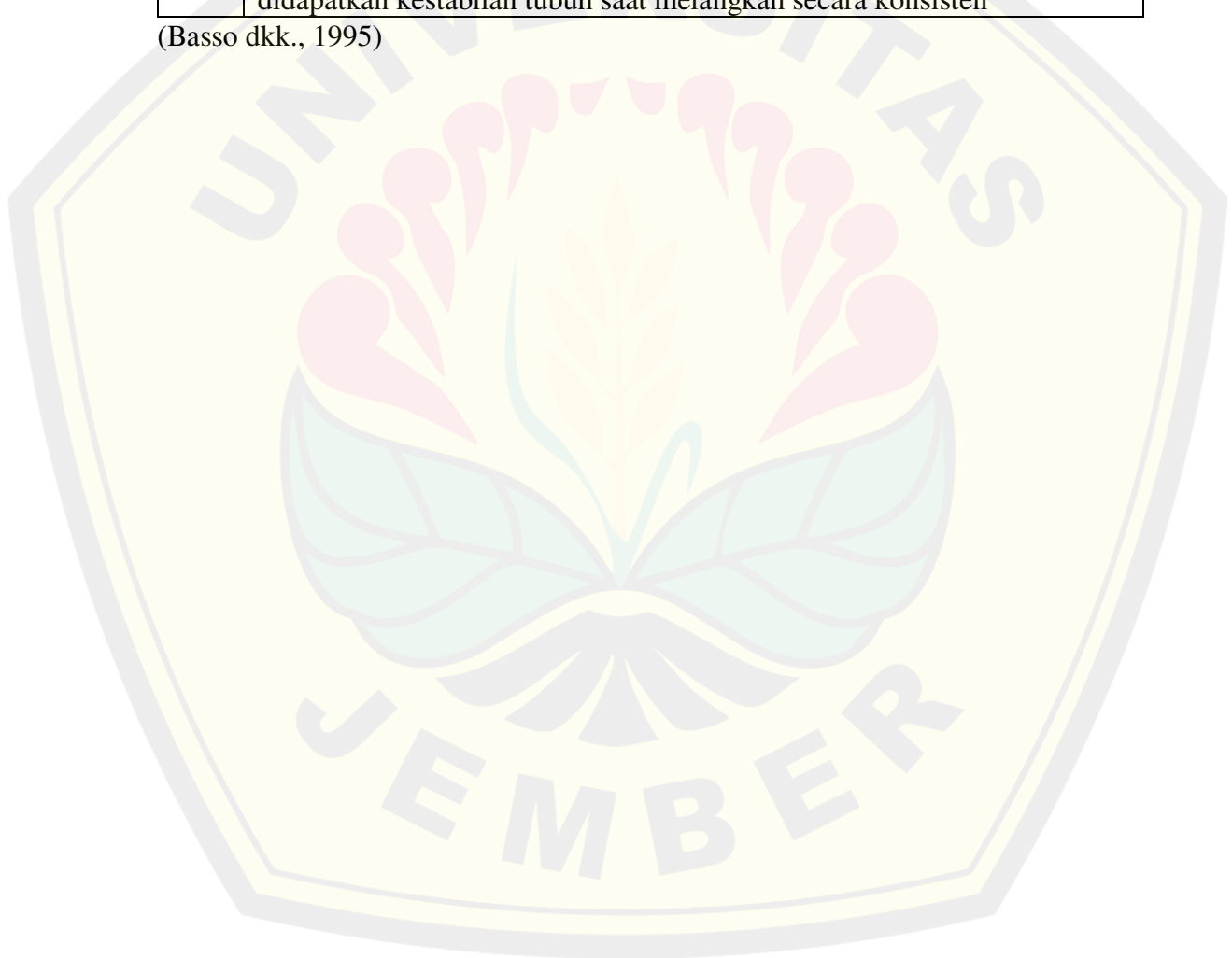
1. Pemberian sekretom dilakukan setelah hari ke-3 pembuatan model *spinal cord injury* pada kelompok perlakuan 1 (Model SCI + Sekretom) sebelum pencucian luka operasi dan penjahitan fascia otot paraspinal.
2. Kelompok perlakuan 1 (Model SCI + Sekretom) dilakukan injeksi sekretom *stem cell* dengan dosis 30 μ l menggunakan spuit 50 μ l secara intratekal (Cizkova dkk., 2018).
3. Injeksi intratekal yaitu injeksi yang dilakukan pada *subarachnoid meter*. Injeksi yang tepat dilakukan pada *subarachnoid meter* ditandai dengan keluarnya cairan CSF saat dilakukan aspirasi.
4. Proses injeksi ini dipertahankan selama 30 detik agar cairan sekretom *stem cell* agar tidak reflux.

Lampiran 3. Lokomotor Skor Basso, Beattie, dan Bresnahan (BBB)

| Skor | Keterangan |
|------|--|
| 0 | Tidak ada Gerakan kaki belakang yang dapat diamati |
| 1 | Terdapat sedikit Gerakan pada satu atau dua sendi (biasanya sendi panggul dan/atau sendi lutut) |
| 2 | Terdapat gerakan ekstensi pada satu sendi dan sedikit Gerakan pada sendi lainnya |
| 3 | Terdapat Gerakan ekstensi pada dua sendi |
| 4 | Terdapat sedikit Gerakan pada ketiga sendi HL |
| 5 | Terdapat sedikit Gerakan pada dua sendi serta Gerakan ekstensi pada satu sendi lainnya |
| 6 | Terdapat Gerakan ekstensi pada dua sendi serta sedikit Gerakan pada satu sendi lainnya |
| 7 | Terdapat Gerakan ekstensi pada ketiga sendi HL |
| 8 | Terdapat gerakan menyapu atau dapat menempatkan plantar sebagai pijakan |
| 9 | Dapat menempatkan plantar sebagai pijakan (misalnya saat berdiri) serta mampu menopang berat badan sesekali maupun konsisten, atau mampu menahan berat badan secara konsisten tanpa adanya pijakan menggunakan plantar namun terdapat bantuan dari bagian dorsal untuk menopang tubuh |
| 10 | Mampu sesekali melangkah menggunakan <i>plantar stepping</i> tanpa adanya koordinasi FL-HL |
| 11 | Sering ataupun konsisten melangkah dengan <i>plantar stepping</i> tanpa adanya koordinasi FL-HL |
| 12 | Sering ataupun konsisten melangkah dengan <i>plantar stepping</i> serta sesekali terdapat koordinasi FL-HL |
| 13 | Sering ataupun konsisten melangkah dengan <i>plantar stepping</i> serta sering terdapat koordinasi FL-HL |
| 14 | Terdapat langkah yang konsisten menggunakan <i>plantar stepping</i> , terdapat koordinasi FL-HL secara konsisten, dan terdapat rotasi (kedalam atau keluar) pada kaki yang dominan saat menyentuh lantai atau permukaan (<i>Initial contact</i>) tepat sebelum diangkatnya kaki; atau didapatkan <i>plantar stepping</i> secara sering, dengan koordinasi FL-HL secara konsisten, serta sesekali adanya <i>dorsal stepping</i> |
| 15 | Terdapat <i>plantar stepping</i> dan koordinasi FL-HL secara konsisten, dan posisi kaki dominan sejajar dengan tubuh saat <i>initial contact</i> |
| 16 | Terdapat <i>plantar stepping</i> dan koordinasi FL-HL secara konsisten dengan Langkah gait; dan terjadi pembersihan jari kaki secara sering saat ekstremitas depan melangkah, posisi kaki dominan sejajar dengan tubuh saat <i>initial contact</i> dan terdapat rotasi sebelum diangkatnya kaki |
| 17 | Terdapat <i>plantar stepping</i> dan koordinasi FL-HL secara konsisten dengan Langkah gait; dan terjadi pembersihan jari kaki secara sering saat ekstremitas depan melangkah, posisi kaki dominan sejajar dengan tubuh saat <i>initial contact</i> dan kaki terangkat |

| | |
|----|--|
| 18 | Terdapat <i>plantar stepping</i> dan koordinasi FL-HL secara konsisten dengan Langkah gait; dan terjadi pembersihan jari kaki secara konsisten saat ekstremitas depan melangkah, posisi kaki dominan sejajar dengan tubuh saat <i>initial contact</i> dan terdapat rotasi sebelum diangkatnya kaki |
| 19 | Terdapat <i>plantar stepping</i> dan koordinasi FL-HL secara konsisten dengan Langkah gait; dan terjadi pembersihan jari kaki secara konsisten saat ekstremitas depan melangkah, posisi kaki dominan sejajar dengan tubuh saat <i>initial contact</i> dan ekor turun Sebagian atau sepanjang waktu |
| 20 | Terdapat <i>plantar stepping</i> dan Langkah yang terkoordinasi secara konsisten; posisi kaki dominan sejajar dengan tubuh saat <i>initial contact</i> dan kaki terangkat; ekor naik secara konsisten; serta terdapat ketidakstabilan pada tubuh saat melangkah |
| 21 | Terdapat <i>plantar stepping</i> dan Langkah yang terkoordinasi secara konsisten; posisi kaki dominan sejajar dengan tubuh; ekor naik serta didapatkan kestabilan tubuh saat melangkah secara konsisten |

(Basso dkk., 1995)



Lampiran 4. Perawatan Post Operasi

Tikus setelah dilakukan model SCI, dilakukan perawatan sebagai berikut:

1. Tikus diletakkan di bawah lampu 5 watt.
2. Tikus diberikan saline fisiologis secara subkutan (s.c) 30-35 ml per hari, salep kulit gentamicin 0,1%, tolfenamic acid 4 mg/kg s.c, dan enrofloxacin 10 mg/kg s.c.
3. Tikus diberikan makan 30-35 gram atau 10% dari BB hewan coba per hari.
4. Makanan dan minuman untuk tikus diberikan pada pukul 08.00 WIB.
5. Tikus dilakukan masase secara manual oleh dua tenaga dokter hewan dan satu tenaga laboran, dilakukan minimal 2 kali sehari pada pukul 08.00 dan 18.00 WIB. apabila terjadi retensi urin.
6. Tikus dilakukan masase pada usus dan di sekitar pangkal ekor secara manual oleh dua tenaga dokter hewan apabila tidak bisa buang air besar.

Lampiran 5. SOP Pemeriksaan F2-Isoprostan Menggunakan ELISA

Pemeriksaan ini menggunakan ELISA Kit 8-epi-PGF2 α (8-Epi-Prostaglandin F2 Alpha) dari Elabscience[®]. Cara Pemeriksaan F2-Isoprostan sebagai berikut:

a. Pengolahan sampel:

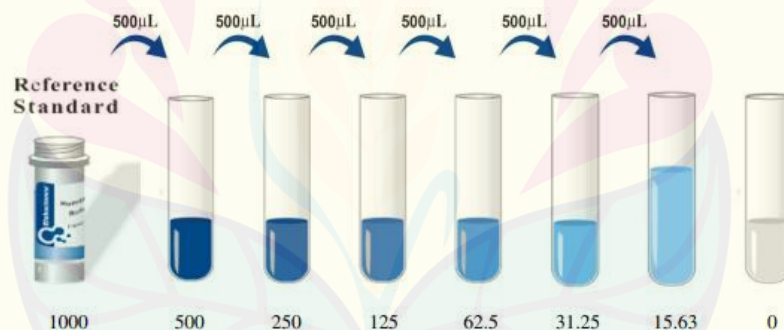
Sampel yang digunakan adalah plasma: *Whole blood* dikumpulkan menggunakan tabung lavender yang berisi EDTA-Na₂ sebagai antikoagulan. Sampel *Whole blood* dilakukan sentrifugasi selama 15 menit pada 1000 × g pada suhu 2-8°C. Lalu supernatan dikumpulkan untuk melakukan pengujian.

b. Penyimpanan sampel:

Sampel apabila digunakan pengujian dalam 7 hari disimpan pada suhu 2-8°C, 1 bulan pada suhu -20°C, atau 3 bulan dalam suhu -80°C.

c. Persiapan reagen:

- 1) Reagen ditaruh pada suhu kamar (18-25°C) sebelum digunakan.
- 2) Wash Buffer: 30 mL *Concentrated Wash Buffer* diencerkan dengan 720 mL aquades untuk mempersiapkan 750 mL Wash Buffer.



- 3) Solusi kerja standar: Sentrifugasi standar pada 10.000 × g selama 1 menit. Tambahkan 1,0 mL Standar Referensi Pengencer Sampel, diamkan selama 10 menit dan balikkan perlahan beberapa kali. Setelah larut sepenuhnya, aduk rata dengan pipet. Rekonstitusi ini menghasilkan larutan kerja 1000 pg/mL (atau tambahkan 1 mL Standar Referensi Pengencer Sampel, diamkan selama 1-2 menit lalu aduk rata dengan vortex meter kecepatan rendah. Gelembung yang dihasilkan selama vortex dapat dihilangkan dengan sentrifugasi pada kecepatan yang relatif rendah). Kemudian buat pengenceran serial sesuai kebutuhan. Gradien pengenceran yang direkomendasikan adalah sebagai berikut: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 0 pg/mL. Metode pengenceran: Ambil 7 tabung EP,

tambahkan 500uL Standar Referensi & Pengencer Sampel ke setiap tabung. Pipet 500 uL larutan kerja 1000 pg/mL ke tabung pertama dan campur hingga menghasilkan larutan kerja 500 pg/mL. Pipet 500 uL larutan dari tabung sebelumnya ke tabung terakhir sesuai dengan langkah ini. Ilustrasi di bawah ini untuk referensi.

- 4) Solusi kerja Ab Deteksi Biotinilasi: Hitung jumlah yang diperlukan sebelum percobaan (50 L/sumur). Dalam persiapan, sedikit lebih dari yang dihitung harus disiapkan. Sentrifugasi Concentrated Biotinylated Detection Ab pada 800×g selama 1 menit, kemudian encerkan 100× Concentrated Biotinylated Detection Ab ke 1× solusi kerja dengan Biotinylated Detection Ab Diluent(Concentrated Biotinylated Detection Ab: Biotinylated Detection Ab Diluent= 1: 99).
- 5) Larutan kerja konjugat HRP Konsentrat: Hitung jumlah yang diperlukan sebelum percobaan (100 L/sumur). Dalam persiapan, sedikit lebih dari yang dihitung harus disiapkan. Sentrifugasi Konjugat HRP Terkonsentrasi pada 800×g selama 1 menit, kemudian encerkan Konjugat HRP Terkonsentrat 100× ke larutan kerja 1× dengan Pengencer Konjugasi HRP(Konjugat HRP Terkonsentrasi: Pengencer Konjugat HRP=1: 99).

Prosedur penetapan kadar

1. Dilakukan penentuan sumur untuk pengenceran standar, blanko dan sampel. ditambahkan 50 L setiap pengenceran standar, blanko dan sampel ke dalam sumur yang sesuai. Segera ditambahkan 50 L larutan kerja Biotinylated Detection Ab ke setiap sumuran. Sumuran ditutupi dengan sealer yang disediakan dalam kit. Kemudian diinkubasi selama 45 menit pada suhu 37°C.
2. Larutan dari setiap sumur dibuang, lalu ditambahkan 350 L *wash buffer* ke setiap sumur. Setiap sumur direndam selama 1 menit dan selanjutnya larutan dari masing-masing sumur dibuang dan dikeringkan dengan tisu. Lalu diulangi langkah pencucian ini sebanyak 3 kali.
3. Larutan kerja HRP Conjugate 100 L ditambahkan ke setiap sumuran. Lalu sumuran ditutupi dengan sealer baru. Dan selanjutnya dilakukan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C.

4. Larutan dari setiap sumur dibuang dan diulangi proses pencucian sebanyak 5 kali seperti yang dilakukan pada langkah 2.
5. 90 L *Substrat Reagent* ditambahkan ke masing-masing sumur. Kemudian sumuran ditutupi dengan sealer baru. Lalu dilakukan inkubasi selama kurang lebih 15 menit pada suhu 37°C dan sumuran dilindungi dari cahaya.
6. 50 L *Stop Solution* ditambahkan ke masing-masing sumuran.
7. Kerapatan optik masing-masing sumur ditentukan sekaligus menggunakan *microplate reader* diatur dengan panjang gelombang 450 nm.



Lampiran 6. Surat Etik Penelitian

| | |
|--|--|
|  | KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITY OF JEMBER) |
| No.1530/UN25.B/KEPK/DL/2022 | |
| Title of research protocol : | * The Effect of Intrathecal Injection of Neural Stem Cell Secretome on Plasma Levels of F2-Isoprostane in Rat with Sub-Acute Spinal Cord Injury Contusion-Compression Model.* |
| Document Approved : | Research Protocol |
| Principal Investigator : | Ahmad Shofiyul Labib |
| Member of research : | - |
| Responsible Physician : | Ahmad Shofiyul Labib |
| Date of approval : | Juni 2021-Januari 2022 |
| Place of research : | Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| <p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry University of Jember States That the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p> <p style="text-align: right;">Jember, April 27th 2022</p> <p style="text-align: right;">Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry University of Jember</p> <div style="text-align: right;">   (Chairperson of Research Ethics Committee) Ayu Ratna Dewanti, M.Si </div> | |

Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian



Aklimatisasi hewan coba selama 7 hari



Persiapan meja operasi model SCI



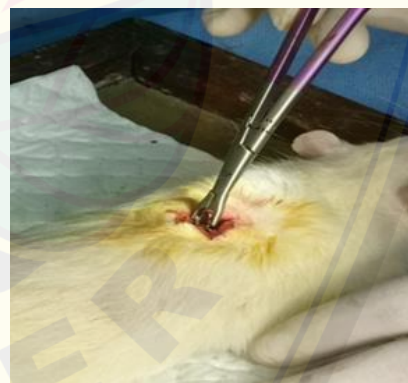
Yasargil *Clip* (beban 65 g, panjang 7 mm dengan gaya tekan 150 kDyne)



Sekretom NSC



Injeksi anestesi pada hewan coba oleh dokter hewan



Pembuatan model SCI kontusio—kompresi dengan Yasargil *Clip*



Injeksi intratekal sekretom NSC pada hari ke-3



Alat dan bahan terminasi



Terminasi dengan induksi anestesi inhalasi eter pada hari ke-28



Persiapan alat untuk pengambilan sampel



Proses pengambilan plasma darah pada *whole blood*



Penyimpanan sampel plasma di dalam freezer dengan suhu -85°C



Pengukuran F2-isoprostan menggunakan ELISA



Pembacaan hasil pengukuran F2-isoprostan menggunakan ELISA reader

