

**PENGARUH *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL
STEM CELLS* (SH-MSCs) TERHADAP KADAR TNF- α
DAN MYOSTATIN**

**(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Mencit Betina Galur C57BL/6 yang
Diinduksi Dexamethasone)**

Tesis

Untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister (S2)



Magister Ilmu Biomedik

Tedy Tanjung

MBK.24.24.010528

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG

SEMARANG

2026

TESIS

**PENGARUH *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS*
(SH-MSCs) TERHADAP KADAR TNF- α DAN MYOSTATIN PADA
MENCIT BETINA GALUR C57BL/6 MODEL SARCOPENIA
(Studi Eksperimental *In Vivo* pada Mencit Betina Galur C57BL/6 yang
Diinduksi Dexamethasone)**

Disusun oleh:

Tedy Tanjaya

MBK.24.24.010528

Telah dipertahankan didepan Tim Penguji pada tanggal 16 Februari 2026
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Titiek Sumarawati, M. Kes. Dr. dr. Eko Setiawan, SpB. FINACS.

NIK. 220 198 045

NIK. 210 113 160

Mengetahui,

Ketua program studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung

Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes

NIK. 210198046

LEMBAR PENGESAHAN DEWAN PENGUJI

Laporan Tesis dengan Judul “PENGARUH *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* (SH-MSCs) TERHADAP KADAR TNF- α DAN MYOSTATIN PADA MENCIT BETINA GALUR C57BL/6 MODEL SARCOPENIA (Studi Eksperimental *In Vivo* pada Mencit Betina Galur C57BL/6 yang Diinduksi Dexamethasone)” ini telah dipertahankan di depan Penguji Sidang Akhir pada:

Hari : Senin
Tanggal : 16 Februari 2026

NO	NAMA	JABATAN	TANDA TANGAN
1.	Dr. dr. Joko Wahyu Wibowo,M.Kes	Penguji I	
2.	Dr. dr. Setyo Trisnadi, S.H.M.H, Sp.KF,M.Ce,Adv.	Penguji II	
3.	Dr. dr. H. Hadi Sarosa, M.Kes	Penguji II	
4.	Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Sumarawati,M.Kes	Pembimbing I	
5.	Dr. dr. Eko Setiawan,Sp.B, FINACS	Pembimbing II	

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan Lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar Pustaka.



Semarang, 16 Februari 2026

Tedy Tanjaya

RIWAYAT HIDUP

Nama : Tedy Tanjaya
Tempat / Tanggal lahir : Jakarta / 12 April 1985
Agama : Kristen
Jenis Kelamin : Laki - Laki
Alamat : Jl. Muara Karang Blok E 5 Barat No. 53, Kel. Pluit,
Kec. Penjaringan, Jakarta Utara

B.Riwayat Pendidikan

1. TK : Sekolah PERMAI
2. SD : Sekolah Harapan Abadi
3. SMP : Sekolah Harapan Abadi
4. SMA : Sekolah DIAKONIA
5. S1 : Fakultas Kedokteran Universitas Krida Wacana
(Ukrida)
6. Pendidikan Profesi Dokter : Fakultas Kedokteran Universitas Krida Wacana
(Ukrida)
7. S2 : Fakultas Kedokteran. Universitas Islam Sultan
Agung. Magister Ilmu Biomedik FK Unissula.
Sedang menjalani pendidikan sejak 2024 hingga
sekarang

C.Riwayat Keluarga

- Ayah : Lukman Tanjaya
- Ibu : Mutiawa Lurin



KATA PENGANTAR

Segala puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan ridho-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis berjudul **“PENGARUH *SECRETOME HYPOXIA MESENCHYMAL STEM CELLS* (SH-MSCs) TERHADAP KADAR TNF- α DAN MYOSTATIN PADA MENCIT BETINA GALUR C57BL/6 MODEL SARCOPENIA (Studi Eksperimental pada Mencit Betina Galur C57BL/6 yang Diinduksi Dexamethasone)”**. Tesis ini disusun sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar Magister Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada berbagai pihak yang telah memberikan dukungan, arahan, dan bantuan dalam proses penyusunan tesis ini, khususnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Gunarto, SH, M. Hum selaku Rektor Universitas Islam Sultan Agung beserta para wakil rektor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan Magister Biomedik.
2. Dr. dr. Eko Setiawan Sp. B. FINACS selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan Pembimbing II dalam

penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulisan selama proses penulisan tesis.

3. Dr.dr. Joko Wahyu Wibowo, M.Kes selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Universitas Islam Sultan Agung Semarang dan Penguji I yang telah meluangkan waktu dan pikiran dalam memberikan penilaian serta saran yang sangat berharga terhadap penelitian ini.
4. Prof. Dr. Ir. Hj. Titiek Suamarawati, M.Kes selaku Dosen Pembimbing I dalam penelitian yang bersedia meluangkan waktu dan pikiran untuk membimbing penulisan selama proses penulisan tesis.
5. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi, S. H, Sp. KF selaku Penguji II yang telah membantu penyempurnaan substansi penelitian dan memperkaya pemahaman penulis dalam aspek metodologi, analisis, dan penulisan ilmiah.
6. Dr. dr. Hadi Sarosa, M.Kes, selaku Penguji III atas kesediaan meluangkan waktu, tenaga, dan pemikiran dalam memberikan penilaian, kritik, serta saran yang konstruktif terhadap penelitian ini.
7. Seluruh tenaga pendidik dan staff administrasi di Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang yang secara langsung maupun tidak langsung telah memberi bantuan kepada penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis.
8. Segenap staf administrasi Program Magister Ilmu Biomedik yang telah membantu dalam kelancaran proses akademik.

9. Semua pihak lain yang turut berkontribusi, baik langsung maupun tidak langsung, yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tesis ini masih terdapat banyak aspek yang perlu diperbaiki. Oleh karena itu, segala masukan dan saran konstruktif dari berbagai pihak sangat diharapkan. Penulis berharap penelitian yang diajukan ini dapat memberikan kontribusi yang berarti dalam memperdalam pemahaman mengenai mekanisme molekuler sarkopenia serta mengeksplorasi potensi terapi berbasis *secretome* SH-MSC, yang pada akhirnya dapat berkontribusi pada pengembangan ilmu pengetahuan dan peningkatan kesehatan masyarakat.



Semarang, 16 Februari 2026

Penulis

Tedy Tanjaya

ABSTRAK

Latar Belakang: Sarcopenia akibat induksi dexamethasone ditandai peningkatan mediator inflamasi seperti TNF- α dan faktor katabolik Myostatin yang berkontribusi terhadap penurunan massa otot. Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs) memiliki potensi antiinflamasi dan antikatabolik melalui modulasi sitokin dan faktor pertumbuhan. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi pengaruh SH-MSCs terhadap kadar TNF- α dan Myostatin pada mencit betina galur C57BL/6 model sarcopenia.

Metode: Penelitian eksperimental in vivo dengan desain post-test only control group menggunakan 24 ekor mencit yang dibagi secara acak menjadi empat kelompok (n=6/kelompok): (1) kelompok sehat tanpa induksi dan tanpa terapi; (2) kontrol negatif, diinduksi dexamethasone 20 mg/kgBB/hari intraperitoneal selama 10 hari tanpa terapi; (3) kelompok perlakuan SH-MSCs 30 μ L setelah induksi dexamethasone; dan (4) kelompok perlakuan SH-MSCs 60 μ L setelah induksi dexamethasone. Pemberian SH-MSCs dilakukan mulai hari ke-12 hingga ke-25. Pada hari ke-39, jaringan otot dianalisis menggunakan metode ELISA.

Hasil: Kadar TNF- α tertinggi terdapat pada kelompok kontrol negatif ($246,00 \pm 33,62$ ng/L), sedangkan kelompok SH-MSCs 30 μ L dan 60 μ L menunjukkan $190,37 \pm 50,79$ ng/L dan $186,87 \pm 35,98$ ng/L ($p=0,097$). Kadar Myostatin tertinggi terdapat pada kontrol negatif dan SH-MSCs 30 μ L ($3,69 \pm 0,18$ pg/mL dan $3,69 \pm 0,15$ pg/mL), sedangkan kelompok SH-MSCs 60 μ L menurun secara deskriptif menjadi $3,59 \pm 0,39$ pg/mL, dan terendah pada mencit sehat ($3,31 \pm 0,41$ pg/mL, $p=0,133$).

Kesimpulan: Pemberian SH-MSCs dosis 30 μ L dan 60 μ L menurunkan kadar TNF- α secara deskriptif, sedangkan penurunan kadar Myostatin hanya terlihat pada dosis 60 μ L, menunjukkan potensi SH-MSCs menekan inflamasi dan ekspresi penghambat pertumbuhan otot pada model sarcopenia, meskipun perbedaan antar kelompok tidak signifikan secara statistik.

Kata kunci: Sarcopenia, SH-MSCs, TNF- α , Myostatin, Dexamethasone

ABSTRACT

Background: Dexamethasone-induced sarcopenia is characterized by increased TNF- α and Myostatin levels and decreased muscle mass. Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells (SH-MSCs) have the potential to suppress inflammation and catabolic factor expression. This study aimed to evaluate the effects of SH-MSCs on TNF- α and Myostatin levels in female C57BL/6 mice with dexamethasone-induced sarcopenia.

Methods: This in vivo experimental study employed a post-test only control group design with 24 mice randomly assigned into four groups (n=6 per group): (1) healthy group without induction or treatment; (2) negative control group induced with dexamethasone 20 mg/kgBW/day intraperitoneally for 10 days without therapy; (3) treatment group receiving SH-MSCs 30 μ L after dexamethasone induction; and (4) treatment group receiving SH-MSCs 60 μ L after dexamethasone induction. SH-MSCs were administered from day 12 to day 25. On day 39, muscle tissue was collected and analyzed using ELISA. TNF- α levels were analyzed using the Kruskal–Wallis test, while myostatin levels were analyzed using One-Way ANOVA ($p < 0.05$).

Results: TNF- α was highest in the negative control (246.00 ± 33.62 ng/L) and lower in SH-MSCs 30 μ L (190.37 ± 50.79 ng/L) and 60 μ L (186.87 ± 35.98 ng/L) groups ($p = 0.097$). Myostatin was highest in the negative control and SH-MSCs 30 μ L groups (3.69 ± 0.18 pg/mL and 3.69 ± 0.15 pg/mL), slightly lower in SH-MSCs 60 μ L (3.59 ± 0.39 pg/mL), and lowest in healthy mice (3.31 ± 0.41 pg/mL, $p = 0.133$).

Conclusion: SH-MSCs administration descriptively reduced TNF- α at both doses, while Myostatin reduction was observed only at 60 μ L, suggesting a potential for SH-MSCs to suppress inflammation and catabolic signaling in sarcopenia, though differences were not statistically significant.

Keywords: Sarcopenia, SH-MSCs, TNF- α , Myostatin, Dexamethasone

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
SURAT PERNYATAAN.....	iv
RIWAYAT HIDUP	v
KATA PENGANTAR.....	vii
ABSTRAK (BAHASA INDONESIA DAN INGGRIS).....	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xx
BAB I.....	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.3.1. Tujuan Umum	4
1.3.2. Tujuan Khusus	4
1.4. Originalitas Penelitian.....	5
1.5. Manfaat Penelitian	10
1.5.1. Manfaat Teoritis.....	10
1.5.2. Manfaat Praktis	11
BAB II.....	12
TINJAUAN PUSTAKA.....	12
2.1. Fisiologi Otot	12
2.1.1. Struktur dan Fungsi Otot.....	12
2.1.2. Proses Anabolisme Otot.....	14
2.1.3. Proses Katabolisme Otot.....	16
2.2. Sarcopenia	18
2.2.1. Definisi Sarcopenia.....	18
2.2.2. Etiologi dan Faktor Risiko Sarcopenia	19
2.2.3. Patofisiologi Sarcopenia	21
2.2.4 Proses Degenerasi dan Regenerasi Otot Skeletal.....	24
2.2.5. Model Sarcopenia pada Hewan (Induksi Dexamethasone)	24

2.3. <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> (TNF- α)	26
2.3.1. Definisi dan Struktur TNF- α	26
2.3.2. Mekanisme Katabolik TNF- α	27
2.3.3. Fungsi TNF- α dalam Peradangan dan Katabolisme Otot	28
2.3.4. TNF- α pada Model Sarcopenia	28
2.4. Myostatin	29
2.4.1. Definisi dan Struktur Myostatin.....	29
2.4.2. Fungsi Myostatin sebagai Regulator Negatif Pertumbuhan Otot.....	30
2.4.4. Mekanisme Katabolik Myostatin melalui Jalur Smad2/3	31
2.4.3. Myostatin pada Kondisi Sarcopenia dan Atrofi Otot.....	32
2.5. <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSCs).....	33
2.5.1. Definisi dan Karakteristik MSCs	33
2.5.2. Sumber MSCs dan Potensi Terapeutiknya.....	34
2.5.3. Mekanisme Imunomodulasi dan Regenerasi oleh MSCs	35
2.6. <i>Secretome Hypoxia-MSCs</i> (SH-MSCs)	36
2.6.1. Definisi dan Komponen Bioaktif dalam SH-MSCs.....	36
2.6.2. Pengaruh Kondisi Hipoksia terhadap Profil <i>Secretome</i>	37
2.6.3. Mekanisme Kerja SH-MSCs pada Regenerasi Otot Skeletal	38
2.6.4. Kelebihan <i>Secretome</i> dibandingkan Terapi Sel Utuh	40
2.7. Dexamethasone (DEX)	41
BAB III.....	43
KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS	43
3.1 Kerangka Teori	43
3.2 Kerangka Konsep.....	47
3.3. Hipotesis.....	47
BAB IV	48
METODE PENELITIAN	48
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian	48
4.2. Populasi dan Sampel Penelitian	50
4.2.1. Populasi dan Sampel.....	50
4.2.2. Besar Sampel	52
4.2.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian	53
4.2.4. Kriteria Inklusi	54

4.2.5. Kriteria Eksklusi	54
4.2.6. Kriteria <i>Drop Out</i>	54
4.3. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian	55
4.3.1. Variabel Penelitian.....	55
4.3.2. Definisi Operasional	55
4.4. Alat dan Bahan Penelitian.....	57
4.4.1. Alat.....	57
4.4.2. Bahan	58
4.5. Cara Penelitian	59
4.5.1. Perolehan <i>Ethical Clearance</i>	59
4.5.2. Aklimatisasi	60
4.5.4. Prosedur Perlakuan dengan Kondisi Hipoksia.....	61
4.5.6. Persiapan Sediaan SH-MSCs untuk Pemberian.....	61
4.5.7. Pembagian Kelompok.....	62
4.5.8. Rute dan Cara Pemberian SH-MSCs	63
4.5.9. Terminasi dan Pengambilan Sampel.....	63
4.5.10. Pemeriksaan Biomarker	63
4.6. Langkah Penelitian.....	66
4.7. Tempat dan Waktu Penelitian.....	68
4.7.1. Tempat Penelitian	68
4.7.2. Waktu Penelitian.....	68
4.8. Metoda Analisis Data.....	68
4.9. Alur Penelitian	70
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	71
5.1 Hasil Penelitian	71
5.1.1 Hasil Validasi SH-MSCs	72
5.1.2 Hasil Validasi Sarcopenia	78
5.1.3 Hasil Pemeriksaan Kadar TNF- α pada Jaringan Otot.....	84
5.1.4 Hasil Pemeriksaan Kadar Myostatin pada Jaringan Otot	86
5.2 Pembahasan.....	89
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	95
6.1	95

Kesimpulan	95
6.2 Saran	96
DAFTAR PUSTAKA.....	97
LAMPIRAN	103
Lampiran <i>Certificate Of Analysis</i>	103
Lampiran Hasil Pemeriksaan Kadar TNF- α dan Myostatin	105
Lampiran Hasil SPSS.....	108



DAFTAR SINGKATAN

ActRIIB/ALK4/5	<i>Aktivator Receptor Type II Bone Morphogenetic Protein/Activin Receptor-Like Kinase 4/5</i>
Akt	<i>Protein Kinase B (sering disebut sebagai AKT)</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
AP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
AWGS	<i>Asian Working Group for Sarcopenia</i>
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMPs	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
CD45 ⁻ /CD34 ⁻	Marker negatif untuk sel hematopoietik
CD73 ⁺ /CD90 ⁺ /CD105 ⁺	Marker sel punca yang menunjukkan ekspresi CD73, CD90, dan CD105
CO ₂	Karbon Dioksida
COA	<i>Certificate of Analysis</i>
DRP1	<i>Dynamin-related protein 1</i>
DXA	<i>Dual-Energy X-Ray Absorptiometry</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EWGSOP2	<i>European Working Group on Sarcopenia in Older People</i>
EV	<i>Extracellular Vesicles</i>
FIS1	<i>Fission 1</i>
FK	Fakultas Kedokteran
GDF-8	<i>Growth Differentiation Factor 8</i>
GSDME	<i>Gasdermin E</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha</i>
IB	<i>Immunoblotting</i>
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
Lal Test	<i>Limulus Amebocyte Lysate Test (uji endotoksin)</i>
MSTN	<i>Myostatin</i>
MuRF-1	<i>Muscle RING Finger-1, protein yang terlibat dalam degradasi protein otot</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>

NaCl	<i>Natrium Klorida</i>
O ₂	<i>Oksigen</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SMAD2/3	<i>Protein yang terlibat dalam pensinyalan TGF-β</i>
SCCR	<i>Stem Cell and Cancer Research</i>
SH-MSCs	<i>Secretome dari Mesenchymal Stem Cells (MSC) yang diperoleh melalui kultur hipoksia</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SOD	<i>Superoxide Dismutase</i>
T2DM	<i>Type 2 Diabetes Mellitus</i>
TFF	<i>Tangential Flow Filtration</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TNFR1	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i>
TNFR2	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 2</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TMB	<i>Tetramethylbenzidine</i>
UC-MSCs	<i>Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
HSD	<i>Honestly Significant Difference (uji post-hoc ANOVA)</i>



DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian	8
Tabel 5.1 Profil Komponen SH-MSCs.....	78
Tabel 5.2 Hasil Pengukuran Berat Badan Mencit Betina C57BL/6.....	79
Tabel 5.3 Deskriptif Rata-rata Kadar TNF- α dan Uji <i>Kruskal-Wallis</i>	84
Tabel 5.4 Deskriptif Rata-rata Kadar Myostatin dan Uji <i>One Way-ANOVA</i>	86



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Representasi skematik jalur mTOR pada sel otot. ²¹	16
Gambar 2.2 Mekanisme Penuaan yang Berkontribusi pada Sarcopenia ³²	23
Gambar 2.3 Mekanisme molekuler atrofi otot akibat glukokortikoid. ³⁵	26
Gambar 2.4 Jalur Pensinyalan Myostatin ^{2,45}	32
Gambar 3.1. Kerangka Teori.....	44
Gambar 3.2. Kerangka Konsep	45
Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian.....	47
Gambar 4.2. Alur Penelitian	68
Gambar 5.1 Morfologi Khas MSC. Morfologi berbentuk fibroblast-like pada pembesaran 100x.....	74
Gambar 5.2 Gating populasi sel MSC yang <i>viable</i>	75
Gambar 5.3 Analisis <i>flow cytometry</i> terhadap ekspresi CD45, CD31,CD90 dan CD29	75
Gambar 5.4 Kemampuan MSCs berdiferensiasi. (A) Berdeferensiasi menjadi <i>Chondrocyte Alician Blue Staining</i> perbesaran 100x.(B) Berdeferensiasi menjadi <i>Osteogenic Alizarin-red staining</i> perbesaran 200x	76
Gambar 5.5 Gambaran Histologi Otot Gastrocnemeus Mencit Betina C57BL/6 .	81
Gambar 5.6 Perbandingan Kadar TNF- α antar Kelompok Perlakuan.....	85
Gambar 5.7 Perbandingan Kadar SOD antar Kelompok Perlakuan.....	87



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran <i>Certificate Of Analysis</i>	103
Lampiran Hasil Pemeriksaan Kadar IL-6 dan SOD	105
Lampiran Hasil SPSS.....	108



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sarcopenia merupakan sindrom progresif yang ditandai dengan penurunan massa otot rangka, kekuatan, dan fungsi fisik, yang berkontribusi terhadap peningkatan risiko jatuh, fraktur, disabilitas, serta penurunan kualitas hidup pada populasi lanjut usia.^{1,2} Prevalensi sarcopenia secara global dilaporkan berkisar antara 10–27% pada lansia dan dapat meningkat hingga 39,2% pada individu dengan komorbid kronik, imobilisasi, atau penggunaan kortikosteroid jangka panjang.^{3,4} Kondisi ini menjadikan sarcopenia sebagai masalah kesehatan masyarakat yang signifikan.

Selain proses penuaan, penggunaan glukokortikoid seperti dexamethasone merupakan salah satu penyebab sarcopenia sekunder. Dexamethasone memiliki efek katabolik kuat pada otot rangka melalui aktivasi reseptor glukokortikoid yang mengganggu keseimbangan anabolisme dan katabolisme otot.⁵ Pemberian dexamethasone terbukti meningkatkan ekspresi gen atrofi otot seperti MuRF-1, Atrogin-1, dan Myostatin, yang berperan dalam aktivasi jalur ubiquitin-proteasome dan penurunan sintesis protein otot.^{5,6}

Secara molekuler, dexamethasone meningkatkan stres oksidatif melalui peningkatan produksi Reactive Oxygen Species (ROS), yang selanjutnya mengaktifasi jalur NF- κ B dan meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi seperti Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α).^{7,8} Aktivasi TNF- α mempercepat degradasi protein otot dengan meningkatkan ekspresi MuRF-1 dan Atrogin-1 serta menghambat jalur anabolik PI3K/Akt/mTOR yang berperan dalam sintesis protein.^{9,10} Selain itu, dexamethasone juga meningkatkan ekspresi Myostatin (GDF-8), suatu regulator negatif pertumbuhan otot yang bekerja melalui aktivasi jalur Smad2/3.^{11,12} Aktivasi jalur ini menghambat proliferasi dan diferensiasi sel otot serta mempercepat katabolisme protein otot.

Interaksi antara TNF- α dan Myostatin membentuk lingkaran umpan balik yang memperburuk proses katabolik otot. Peningkatan TNF- α dapat menstimulasi ekspresi Myostatin, dan sebaliknya, Myostatin dapat meningkatkan stres oksidatif dan aktivasi jalur inflamasi, sehingga mempercepat terjadinya atrofi otot.^{13,14} Mekanisme ini mendasari penggunaan dexamethasone sebagai model hewan untuk merepresentasikan sarcopenia sekunder akibat glukokortikoid.^{14,15}

Terapi yang tersedia saat ini, seperti latihan resistensi dan suplementasi nutrisi (leusin, vitamin D), menunjukkan hasil yang positif dalam mempertahankan massa otot, namun efektivitasnya terbatas terutama pada kondisi atrofi berat akibat paparan glukokortikoid.^{3,4} Pendekatan biologis seperti inhibitor myostatin, senolytics, serta terapi berbasis secretome dari mesenchymal stem cells (MSCs)

menunjukkan hasil yang menjanjikan dalam modulasi inflamasi dan regenerasi otot.^{6,14}

Secretome MSC mengandung berbagai molekul bioaktif seperti sitokin antiinflamasi, growth factors, miRNA, dan extracellular vesicles yang berperan dalam menekan inflamasi dan mendukung regenerasi jaringan.^{16,17} Dibandingkan terapi sel utuh, secretome bersifat cell-free, lebih aman, tidak menimbulkan risiko imunogenisitas, dan lebih mudah distandardisasi.¹⁰ Kondisi hipoksia diketahui dapat meningkatkan potensi terapeutik MSC melalui peningkatan ekspresi faktor protektif yang bersifat imunomodulator dan regeneratif.¹⁰

Namun, hingga saat ini belum banyak penelitian yang secara spesifik mengevaluasi efek Secretome Hypoxia-MSCs (SH-MSCs) terhadap biomarker utama inflamasi dan katabolisme otot seperti TNF- α dan Myostatin pada model sarcopenia yang diinduksi dexamethasone. Oleh karena itu, penelitian ini penting dilakukan untuk mengevaluasi potensi SH-MSCs dalam memodulasi jalur inflamasi dan katabolik serta memperbaiki homeostasis otot pada kondisi sarcopenia sekunder akibat glukokortikoid.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah pemberian *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) secara sistemik dapat menurunkan kadar TNF- α dan Myostatin pada mencit betina galur C57BL/6 model sarcopenia yang diinduksi dexamethasone?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) terhadap kadar TNF- α dan Myostatin pada mencit betina galur C57BL/6 model sarcopenia yang diinduksi dexamethasone secara *in vivo*.

1.3.2. Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Menganalisa perbedaan kadar TNF- α dan myostatin dalam model sarcopenia pada mencit betina galur C57BL/6 antara kelompok kontrol negatif, dan kelompok perlakuan dengan variasi dosis SH-MSCs (30 μ L, 60 μ L).
2. Menganalisa hubungan antara kadar TNF- α dengan myostatin pada seluruh kelompok perlakuan untuk memahami kolerasi antara peradangan sistemik dan penghambat pertumbuhan otot dalam model sarcopenia.
3. Menganalisa potensi terapi SH-MSCs dalam menurunkan kadar protein-protein yang terlibat dalam katabolisme otot dan meningkatkan kondisi otot pada model sarcopenia.

1.4. Originalitas Penelitian

Tabel 1.1. Originalitas Penelitian

No.	Peneliti, Tahun	Judul	Metode	Hasil Penelitian
1	Irawan <i>et al.</i> (2023)	<i>Secretome hypoxia-mesenchymal stem cells decrease tumor necrosis factor-α and interleukin-18 in kidney of type 2 diabetes mellitus model rats</i>	<i>In vivo</i>	Pemberian SH-MSCs dengan dosis 500 μ L secara signifikan menurunkan kadar TNF- α dan IL-18 pada ginjal mencit model T2DM dibandingkan kelompok kontrol. ⁸
2	Sandonà <i>et al.</i> (2017)	<i>Extracellular Vesicles from Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Enhance Muscle Regeneration in a Mouse Model of Muscle Damage</i>	<i>In vivo</i>	<i>Extracellular Vesicles</i> dari MSC adiposa manusia meningkatkan regenerasi otot dengan memodulasi inflamasi dan meningkatkan kadar miRNA yang terlibat dalam perbaikan otot. ⁹
3	Langendorf <i>et al.</i> (2020)	<i>Detecting the Effects of the Glucocorticoid Dexamethasone on Primary Human Skeletal Muscle Cells—Differences to the Murine Cell Line</i>	<i>In vivo</i>	Dexamethasone meningkatkan kadar gen atrofi otot seperti MuRF1, Atrogin-1, dan Myostatin, menandakan perannya dalam aktivasi jalur katabolik dan hambatan pertumbuhan otot. ¹¹
4	Kartika <i>et al.</i> (2024)	<i>New Insight in Using of Mesenchyme Stem Cell Conditioning Medium for the Impaired Muscle related Biomarkers: In vivo Study with Rat Model</i>	<i>In vivo</i>	Pemberian <i>secretome</i> MSC meningkatkan kadar SOD dan VEGF, serta menurunkan kadar CRP dan myostatin, menunjukkan potensi terapi dalam

				memperbaiki biomarker sarcopenia. ¹²
5	Sari et al. (2023)	<i>The Role of Mesenchymal Stem Cell Secretome in the Inflammatory Mediators and the Survival Rate of Rat Model of Sepsis</i>	<i>In vivo</i>	pemberian <i>secretome</i> MSC pada model sepsis mencit dapat menurunkan ekspresi NF- κ B p65/p50 dan TNF- α , serta meningkatkan kadar IL-10, yang berfungsi sebagai anti-inflamasi. Dosis 300 μ L terbukti lebih efektif dalam memodulasi mediator inflamasi dibandingkan dosis 150 μ L. ¹⁰
6	Li & Reid, (2000)	<i>NF-κB Mediates the Protein Loss Induced by TNF-α in Differentiated Skeletal Muscle Myotubes</i>	Kultur Sel dan Transfeksi	NF- κ B memediasi kehilangan protein yang diinduksi oleh TNF- α pada sel otot rangka yang berdiferensiasi. Pemblokiran NF- κ B mencegah kehilangan protein pada myotube yang diekspos TNF- α . ¹³
7	St. Andre et al. (2017)	<i>A Mouse Anti-Myostatin Antibody Increases Muscle Mass and Improves Muscle Strength and Contractility in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy</i>	<i>In vivo</i>	mRK35 meningkatkan massa otot, kekuatan otot, dan fungsi otot pada mencit mdx. Domagrozumab meningkatkan massa otot dan volume pada primata non-manusia. ¹⁴
8	Gupta et al. (2021)	<i>Dosing Extracellular Vesicles (EVs) for Therapeutic Purposes</i>	Analisis	Tidak ada protokol dosis standar yang diterima secara luas. Penelitian

menyarankan fokus
pada aspek kualitatif
dalam dosis EV, seperti
potensi muatan
terapeutik, untuk
meningkatkan
reprodusibilitas dan
konsistensi.¹⁵

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi potensi *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) sebagai terapi sarcopenia dengan fokus pada pengaruhnya terhadap kadar TNF- α dan myostatin pada mencit betina galur C57BL/6 yang diinduksi dengan dexamethasone. Berbeda dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang lebih banyak mengeksplorasi aplikasi SH-MSCs pada kondisi lain seperti diabetes tipe 2 atau kerusakan otot akibat trauma, penelitian ini secara khusus mengkaji efek SH-MSCs dalam konteks sarcopenia yang diinduksi glukokortikoid. Selain itu, penelitian ini mengintegrasikan konsep pra-kondisioning hipoksia untuk meningkatkan efek terapeutik SH-MSCs dalam mengatasi kerusakan otot yang disebabkan oleh dexamethasone.

Studi Irawan *et al.* (2023) menunjukkan bahwa pemberian SH-MSCs dengan dosis tinggi (500 μ L) mampu menurunkan TNF- α dan IL-18 pada ginjal mencit model T2DM, namun belum mengeksplorasi konteks sarcopenia.⁸ Penelitian ini berbeda karena menggunakan dosis lebih kecil

(30 μ L, 60 μ L) dan diarahkan pada biomarker otot (TNF- α dan myostatin) pada model sarcopenia.

Sandonà *et al.* (2017) mengevaluasi *extracellular vesicles* (EVs) dari MSC adiposa manusia yang meningkatkan regenerasi otot, terutama melalui modulasi inflamasi dan perbaikan otot.⁹ Namun, penelitian ini lebih menekankan pada SH-MSCs pra-kondisi hipoksia, bukan EVs, serta berfokus pada peran TNF- α dan myostatin sebagai indikator kerusakan otot pada sarcopenia.

Langendorf *et al.* (2020) membuktikan bahwa dexamethasone dapat meningkatkan ekspresi gen atrofi otot seperti MuRF-1, Atrogin-1, dan Myostatin pada sel otot manusia primer, menandakan aktivasi jalur katabolik.¹¹ Berbeda dengan penelitian tersebut, studi ini tidak hanya melihat efek induksi dexamethasone, tetapi juga intervensi SH-MSCs sebagai terapi potensial untuk menghambat jalur katabolik otot.

Kartika *et al.* (2024) meneliti efek secretome MSC pada model sarcopenia mencit dan menemukan peningkatan SOD, VEGF serta penurunan CRP dan myostatin.¹² Namun penelitian ini menggunakan secretome MSC konvensional, sedangkan penelitian ini menggunakan SH-MSCs (hipoksia) dengan variasi dosis lebih rendah (30 μ L, 60 μ L) yang diharapkan memberi efek lebih kuat melalui mekanisme hipoksia.

Studi Sari *et al.* (2023) menggunakan model sepsis dan menunjukkan bahwa secretome MSC dapat menurunkan NF- κ B p65/p50 dan TNF- α serta

meningkatkan IL-10.¹⁰ Akan tetapi, model ini berbeda dari sarcopenia, sehingga penelitian ini memberikan konteks baru dengan mengevaluasi peran SH-MSCs terhadap inflamasi dan katabolisme otot yang diinduksi dexamethasone.

Li dan Reid (2000) menunjukkan bahwa TNF- α menginduksi kehilangan protein pada myotube otot rangka melalui aktivasi jalur Nuclear Factor- κ B (NF- κ B). Dalam studi in vitro tersebut, paparan TNF- α meningkatkan degradasi protein tanpa menyebabkan apoptosis yang signifikan, menandakan aktivasi mekanisme proteolitik spesifik. TNF- α memicu degradasi inhibitor I κ B sehingga memungkinkan translokasi subunit NF- κ B ke dalam inti sel dan mengaktifkan transkripsi gen-gen katabolik. Ketika aktivasi NF- κ B dihambat, efek kehilangan protein akibat TNF- α dapat dicegah, membuktikan bahwa NF- κ B merupakan mediator utama dalam proses ini. Aktivasi jalur tersebut meningkatkan ekspresi komponen sistem ubiquitin-proteasome, termasuk ligase E3 seperti MuRF-1 dan Atrogin-1, yang berperan dalam degradasi protein miofibril. Temuan ini memperkuat peran TNF- α sebagai mediator penting katabolisme otot pada kondisi inflamasi kronis dan relevan dalam patofisiologi sarcopenia maupun atrofi otot akibat glukokortikoid.¹³

St. Andre *et al.* (2017) menggunakan antibodi anti-myostatin untuk meningkatkan massa otot pada model mdx, namun belum melibatkan SH-MSCs.¹⁴

Gupta *et al.* (2021) menyoroti bahwa dosis EVs belum terstandarisasi, dan menekankan pentingnya uji variasi dosis.¹⁵ Sejalan dengan itu, penelitian ini menguji dosis bervariasi SH-MSCs (30 μ L, 60 μ L) dengan periode perlakuan 10 hari, untuk mengevaluasi apakah perbedaan dosis memberikan pengaruh yang berbeda terhadap penurunan TNF- α dan myostatin.

Dengan demikian, meskipun terdapat bukti bahwa SH-MSCs berpotensi menurunkan inflamasi dan biomarker katabolisme otot, belum ada penelitian yang secara spesifik mengevaluasi efek SH-MSCs pra-kondisi hipoksia pada model sarcopenia induksi dexamethasone dengan fokus pada TNF- α dan myostatin serta menggunakan variasi dosis kecil (30 μ L, 60 μ L). Oleh karena itu, penelitian ini menawarkan kontribusi baru dalam memperluas pemahaman mekanisme terapi SH-MSCs untuk sarcopenia dan membuka peluang strategi intervensi inovatif terhadap kerusakan otot akibat glukokortikoid jangka panjang.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Manfaat Teoritis

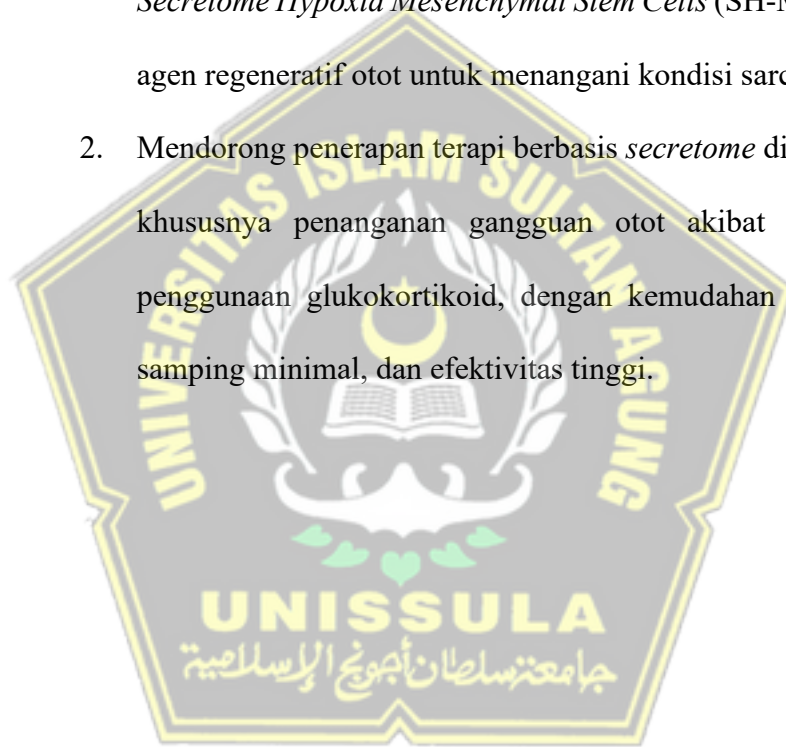
Penelitian ini diharapkan memberikan kontribusi signifikan terhadap pengembangan ilmu pengetahuan di bidang biomedik, khususnya dalam pengembangan terapi regeneratif otot melalui pendekatan *cell-free* berbasis *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs). Hasil penelitian ini juga dapat memperkaya wawasan mengenai peran TNF- α dan Myostatin

sebagai biomarker penting dalam regulasi anabolisme dan katabolisme otot pada kondisi sarcopenia.

1.5.2. Manfaat Praktis

Manfaat praktis dari penelitian ini meliputi:

1. Menjadi dasar ilmiah bagi pengembangan terapi berbasis *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) sebagai agen regeneratif otot untuk menangani kondisi sarcopenia.
2. Mendorong penerapan terapi berbasis *secretome* di bidang klinis, khususnya penanganan gangguan otot akibat penuaan atau penggunaan glukokortikoid, dengan kemudahan aplikasi, efek samping minimal, dan efektivitas tinggi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Fisiologi Otot

2.1.1. Struktur dan Fungsi Otot

Otot merupakan jaringan yang sangat vital dalam tubuh manusia, berperan dalam berbagai fungsi mulai dari gerakan tubuh hingga perlindungan organ internal. Struktur otot terbagi menjadi tiga tipe utama, yaitu otot rangka, otot polos, dan otot jantung. Otot rangka terdiri dari serat-serat panjang yang membentuk miofibril yang tersusun rapi, yang berfungsi untuk menghasilkan gerakan tubuh melalui kontraksi. Miofibril ini terdiri dari dua filamen protein utama, yaitu aktin dan miosin, yang memungkinkan otot untuk berkontraksi secara efektif. Otot rangka bekerja secara sadar dan dikendalikan oleh sistem saraf somatik, yang memungkinkan kita melakukan berbagai aktivitas fisik seperti berjalan, berlari, atau mengangkat benda.¹⁶

Otot polos yang terdapat di dinding organ internal seperti usus dan pembuluh darah, memiliki struktur yang lebih ramping dan berfungsi secara tidak sadar. Otot ini berkontraksi lebih lambat namun memiliki daya tahan yang lebih lama dibandingkan otot rangka.¹⁷ Otot jantung, yang hanya ditemukan pada jantung, memiliki struktur yang mirip dengan otot rangka namun lebih bercabang dan terhubung melalui diskus interkalaris, yang

memastikan kontraksi jantung yang terkoordinasi dan efisien dalam memompa darah ke seluruh tubuh.¹⁸

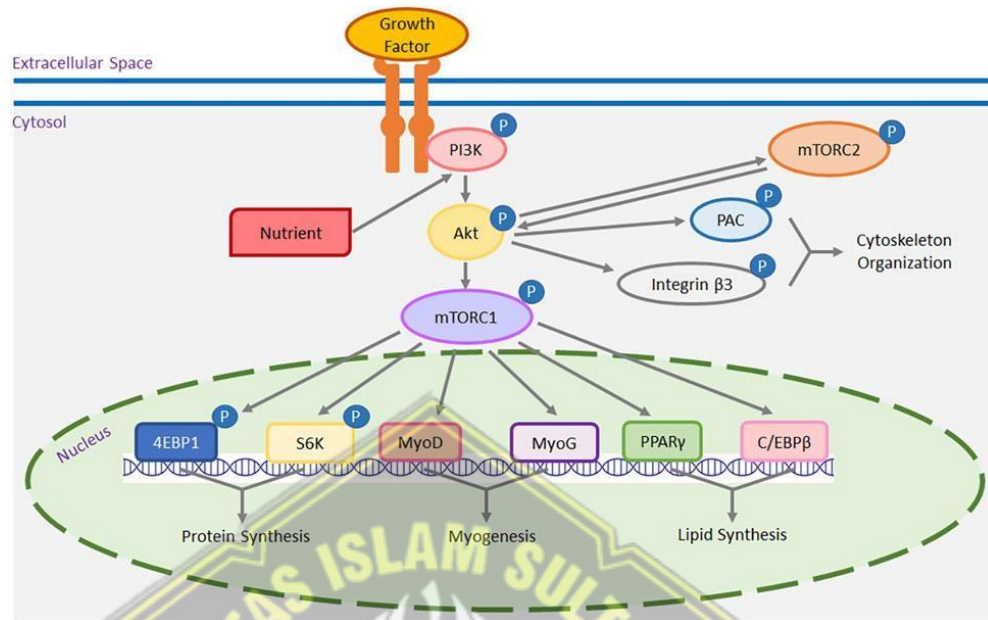
Fungsi otot dalam tubuh manusia sangat beragam dan esensial untuk kelangsungan hidup. Fungsi utama otot adalah untuk menghasilkan gerakan dalam kehidupan sehari-hari. Otot rangka berperan dalam setiap gerakan tubuh, mulai dari gerakan halus seperti menulis hingga gerakan kasar seperti berlari atau mengangkat beban. Selain itu, otot-otot tubuh juga berperan dalam mempertahankan postur tubuh yang stabil, menjaga keseimbangan saat berdiri atau bergerak. Otot-otot inti, seperti otot-otot di perut dan punggung, memiliki peran kunci dalam menjaga posisi tubuh tetap tegak dan memberikan dukungan saat bergerak. Otot juga berfungsi untuk melindungi organ-organ vital dalam tubuh. Otot perut, misalnya, berfungsi sebagai pelindung bagi organ-organ seperti hati dan ginjal. Selain fungsi mekanis, otot juga berperan dalam pengaturan suhu tubuh dengan menghasilkan panas melalui proses kontraksi. Hal ini sangat penting dalam menjaga suhu tubuh dalam batas normal, terutama selama aktivitas fisik. Otot jantung juga memiliki fungsi krusial dalam menjaga sirkulasi darah. Dengan kontraksinya yang terkoordinasi, otot jantung memompa darah ke seluruh tubuh, mengangkut oksigen dan nutrisi, serta membuang produk limbah metabolik.¹⁹

2.1.2. Proses Anabolisme Otot

Anabolisme otot adalah proses biologis yang mengarah pada peningkatan massa otot melalui sintesis protein otot yang baru. Proses ini terjadi ketika tubuh mengalami keseimbangan positif nitrogen, di mana jumlah protein yang dibangun melebihi jumlah protein yang dihancurkan. Proses anabolisme otot terutama melibatkan sintesis protein otot, yang terjadi di dalam sel-sel otot yang disebut miofibril. Sintesis protein ini mencakup pembentukan protein kontraktil seperti aktin dan miosin, yang menyusun struktur dasar otot, serta berbagai protein struktural lainnya yang mendukung integritas jaringan otot.²⁰

Jalur utama yang terlibat dalam anabolisme otot adalah jalur sintesis protein otot, yang dipicu oleh beberapa faktor seperti latihan beban, asupan nutrisi, dan hormon anabolik. Aktivitas latihan fisik, terutama yang berfokus pada ketahanan atau beban, menyebabkan kerusakan mikro pada serat otot, yang kemudian memicu perbaikan dan pertumbuhan melalui proses sintesis protein. Hormon-hormon seperti insulin, hormon pertumbuhan (GH), dan testosteron memainkan peran penting dalam mengatur jalur anabolisme ini. Insulin, misalnya, membantu dalam meningkatkan pengambilan glukosa dan asam amino yang diperlukan untuk sintesis protein, sementara hormon pertumbuhan berperan dalam merangsang pembelahan dan diferensiasi sel-sel otot.²¹

Jalur sinyal yang terlibat dalam anabolisme otot mencakup mekanisme utama seperti jalur mTOR yang berperan dalam pengaturan sintesis protein. mTOR diaktifkan oleh faktor-faktor seperti nutrisi, hormon, dan stres mekanis, dan bertanggung jawab untuk meningkatkan sintesis protein otot.²² Faktor transkripsi seperti MyoD dan Myogenin juga terlibat dalam regulasi diferensiasi sel-sel otot dan pembentukan serat otot. Ekspresi dan aktivitas MyoD dipengaruhi oleh aktivasi jalur PI3K/Akt/mTOR yang berperan dalam regulasi sintesis protein dan diferensiasi otot. Jalur ini diaktifkan oleh faktor-faktor seperti asupan nutrisi (terutama asam amino), hormon anabolik seperti insulin dan IGF-1, serta stimulasi mekanis akibat latihan resistensi. Aktivasi mTOR mendukung proses myogenesis dengan meningkatkan translasi protein dan ekspresi faktor miogenik, termasuk MyoD dan Myogenin. Sebaliknya, penurunan aktivitas mTOR pada kondisi katabolik atau inflamasi dapat menghambat ekspresi MyoD dan mengganggu diferensiasi serta regenerasi sel otot.²² MyoD berfungsi untuk mengaktifkan gen-gen yang diperlukan untuk diferensiasi dan pertumbuhan otot, sementara Myogenin memainkan peran dalam penggabungan sel-sel otot yang baru dibentuk menjadi serat otot yang lebih besar dan lebih kuat.²³



Gambar 2.1 Representasi skematik jalur mTOR pada sel otot.²³

Proses anabolisme otot ini dapat terganggu seiring bertambahnya usia, yang berkontribusi pada kondisi yang dikenal sebagai sarcopenia. Sarcopenia adalah hilangnya massa otot dan kekuatan yang terkait dengan penuaan. Proses ini melibatkan jalur anabolisme yang terganggu, terutama melalui penurunan aktivitas jalur mTOR dan faktor-faktor transkripsi yang diperlukan untuk regenerasi otot. Faktor-faktor seperti penurunan kadar hormon anabolik (misalnya testosteron dan hormon pertumbuhan) dan peningkatan peradangan sistemik juga berkontribusi terhadap perkembangan sarcopenia dengan menghambat proses anabolisme otot yang normal.²⁴

2.1.3. Proses Katabolisme Otot

Katabolisme otot adalah proses fisiologis di mana jaringan otot mengalami degradasi atau penguraian protein otot menjadi asam amino, yang

kemudian dapat digunakan untuk energi atau sintesis protein lainnya.²⁵ Proses katabolisme terjadi dalam keadaan tubuh mengalami keseimbangan negatif nitrogen, di mana jumlah protein yang dihancurkan lebih banyak daripada jumlah protein yang dibangun. Katabolisme otot terutama melibatkan mekanisme proteolisis, yaitu penguraian protein otot melalui berbagai jalur, seperti sistem ubiquitin-proteasome dan autofagi. Jalur proteolisis ini memungkinkan tubuh untuk memecah protein kontraktile otot seperti aktin dan miosin serta protein struktural lainnya yang ada di dalam serat otot. Proses degradasi ini penting untuk memenuhi kebutuhan energi tubuh terutama saat terjadi kekurangan energi atau dalam kondisi stres.²⁶

Hormon-hormon memainkan peran signifikan dalam pengaturan katabolisme otot. Kortisol, misalnya, merupakan hormon glukokortikoid yang berfungsi dalam mengatur respons tubuh terhadap stres. Kortisol meningkatkan katabolisme otot dengan merangsang jalur proteolisis, terutama pada kondisi stres atau ketidakseimbangan energi. Hormon lain yang berperan adalah adrenalin, yang juga dapat meningkatkan katabolisme otot dengan memobilisasi asam amino dari jaringan otot untuk digunakan dalam produksi energi.²⁷ Ketidakseimbangan antara hormon anabolik dan katabolik, seperti penurunan kadar testosteron atau hormon pertumbuhan, dapat memperburuk katabolisme otot, terutama pada individu yang lebih tua.

Faktor-faktor seperti stres, glukokortikoid, dan kondisi medis tertentu dapat mempercepat proses katabolisme otot. Stres fisik dan emosional,

misalnya, dapat meningkatkan sekresi glukokortikoid yang pada gilirannya memicu degradasi protein otot. Selain itu, malnutrisi dan kurangnya asupan protein juga dapat mempercepat katabolisme otot karena tubuh akan mulai memecah jaringan otot untuk memenuhi kebutuhan asam amino. Infeksi, peradangan, dan kondisi medis lainnya seperti penyakit kronis atau kanker juga dapat meningkatkan kadar sitokin proinflamasi, yang lebih lanjut merangsang katabolisme otot.²⁸

Proses katabolisme otot ini juga berperan dalam perkembangan sarcopenia, yaitu kondisi hilangnya massa otot yang terkait dengan penuaan. Sarcopenia melibatkan jalur katabolisme yang berlebihan, terutama peningkatan aktivitas proteolisis yang dipicu oleh penurunan hormon anabolik seperti testosteron dan hormon pertumbuhan, serta peningkatan hormon katabolik seperti kortisol. Selain itu, peningkatan peradangan sistemik yang terjadi seiring bertambahnya usia juga memperburuk katabolisme otot, menghambat proses regenerasi otot yang normal, dan memicu hilangnya massa otot yang signifikan. Akumulasi gangguan dalam keseimbangan antara proses anabolik dan katabolik ini berkontribusi pada penurunan kekuatan dan fungsi otot pada individu yang lebih tua.²⁹

2.2. Sarcopenia

2.2.1. Definisi Sarcopenia

Sarcopenia adalah kondisi progresif yang ditandai dengan penurunan massa otot rangka, kekuatan, dan fungsi tubuh, yang sering kali terkait dengan

proses penuaan. Definisi sarcopenia telah berkembang seiring waktu, dengan penekanan pada tiga aspek utama, yaitu massa otot, kekuatan otot, dan kemampuan fungsional tubuh. Sarcopenia bukan hanya masalah penurunan massa otot, tetapi juga mencakup gangguan kekuatan otot dan kemampuan fisik, yang dapat meningkatkan risiko disabilitas dan penurunan kualitas hidup pada individu lanjut usia.³⁰

Diagnosis sarcopenia umumnya melibatkan pengukuran massa otot menggunakan alat seperti *dual-energy X-ray absorptiometry* (DXA), serta evaluasi kekuatan otot dan kemampuan fungsional tubuh, seperti pengujian kecepatan berjalan dan kemampuan untuk berdiri dari kursi tanpa bantuan. Pedoman internasional, seperti yang dikeluarkan oleh *European Working Group on Sarcopenia in Older People* (EWGSOP2) dan *Asian Working Group for Sarcopenia* (AWGS 2019), menggarisbawahi pentingnya evaluasi kekuatan otot dan kinerja fisik sebagai bagian dari diagnosa sarcopenia.³⁰

2.2.2. Etiologi dan Faktor Risiko Sarcopenia

Penurunan massa otot yang terjadi seiring bertambahnya usia dapat dipengaruhi oleh perubahan fisiologis dalam tubuh yang terjadi secara alami, namun beberapa faktor risiko dapat memperburuk perkembangan sarcopenia. Beberapa faktor eksternal, seperti kurangnya aktivitas fisik, pola makan yang tidak seimbang, serta faktor lingkungan lainnya, juga memainkan peran besar dalam perkembangan sarcopenia. Pada individu yang tidak aktif secara fisik, otot tidak menerima stimulus yang cukup untuk mempertahankan massa dan

kekuatan otot, sehingga meningkatkan risiko terjadinya atrofi otot. Obesitas merupakan faktor risiko utama untuk sarcopenia pada usia pertengahan dan lansia. Kelebihan lemak tubuh dapat memengaruhi metabolisme otot, meningkatkan inflamasi, dan menurunkan sensitivitas terhadap insulin, yang semuanya dapat memperburuk penurunan massa otot. Pada individu yang lebih tua dan kelebihan berat badan, ekspresi gen myostatin ditemukan lebih tinggi, yang mengindikasikan peran myostatin dalam memperburuk sarcopenia terkait obesitas.³¹

Perubahan dalam kadar hormon, terutama hormon yang berperan dalam regulasi metabolisme dan pertumbuhan otot, juga berkontribusi terhadap sarcopenia. Penurunan kadar testosteron pada pria dan estrogen pada wanita seiring bertambahnya usia dapat memperburuk proses katabolisme otot. Selain itu, penurunan kadar hormon pertumbuhan (GH) dan IGF-1 juga berperan dalam menurunkan kemampuan tubuh untuk membangun dan mempertahankan massa otot. Faktor genetik juga memainkan peran dalam sensitivitas terhadap perubahan hormonal ini, yang membuat beberapa individu lebih rentan terhadap sarcopenia daripada yang lainnya.

Secara keseluruhan, etiologi sarcopenia bersifat multifaktorial, melibatkan interaksi antara faktor genetik, metabolik, hormonal, gaya hidup, dan lingkungan. Pengenalan faktor risiko ini penting dalam upaya pencegahan dan pengelolaan sarcopenia, terutama dengan intervensi gaya

hidup yang dapat memperbaiki kualitas otot dan mencegah penurunan fungsional pada individu yang lebih tua.^{31,32}

2.2.3. Patofisiologi Sarcopenia

Penurunan massa otot, kekuatan otot, dan fungsi otot yang terjadi pada penderita sarcopenia dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk perubahan hormonal, metabolik, inflamasi, dan perubahan seluler pada otot. Salah satu faktor utama yang berperan dalam patofisiologi sarcopenia adalah peran sitokin pro-inflamasi, terutama TNF- α . Peningkatan kadar TNF- α pada individu lanjut usia memicu proses inflamasi kronis, yang dikenal sebagai inflamm-aging, yang berkontribusi pada degradasi massa otot. TNF- α bekerja dengan mengaktifkan jalur pensinyalan NF- κ B, yang mengarah pada kadar gen yang merangsang katabolisme otot dan menghambat proses sintesis protein otot. Selain itu, TNF- α juga dapat mengurangi aktivitas sel-satelit (sel progenitor atau *stem cell* yang terdapat pada otot rangka), yang berperan penting dalam pemeliharaan dan perbaikan otot setelah cedera. Proses ini menghambat regenerasi otot yang diperlukan untuk menjaga massa otot pada usia lanjut³³.

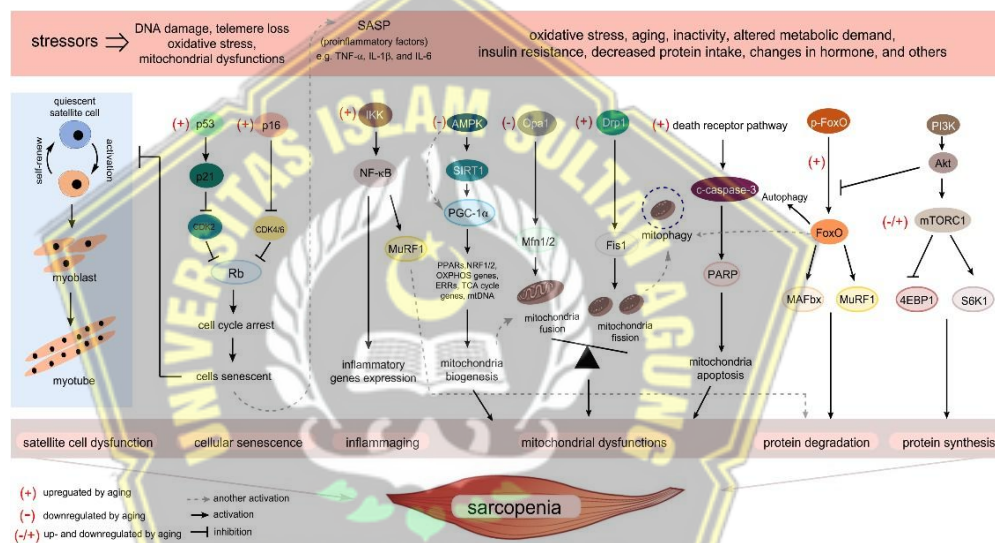
Myostatin juga memainkan peran krusial dalam patofisiologi sarcopenia. Myostatin adalah protein yang diproduksi oleh sel otot dan berfungsi sebagai penghambat pertumbuhan otot. Pada kondisi sarcopenia, kadar myostatin cenderung meningkat, yang mengarah pada penghambatan proses myogenesis atau pembentukan otot baru. Peningkatan kadar myostatin

menyebabkan berkurangnya diferensiasi dan proliferasi mioblas, yang berperan dalam perbaikan otot, serta meningkatkan degradasi protein otot melalui jalur ubiquitin-proteasome. Secara keseluruhan, myostatin berfungsi untuk menghambat proses anabolik otot, memperburuk kondisi penurunan massa otot yang terjadi pada sarcopenia³¹.

Interaksi antara TNF- α dan myostatin semakin memperburuk patofisiologi sarcopenia, di mana kedua molekul ini saling berinteraksi dalam mempercepat proses katabolisme otot. Peningkatan TNF- α dapat merangsang kadar myostatin, dan sebaliknya, myostatin dapat memicu peningkatan produksi TNF- α melalui mekanisme inflamasi. Hal ini menciptakan lingkaran umpan balik positif yang memperburuk kehilangan massa otot. Dengan meningkatnya kadar kedua molekul ini, proses katabolisme otot menjadi lebih dominan dibandingkan dengan sintesis otot, yang berujung pada kondisi sarcopenia yang semakin parah pada individu lanjut usia.

Penuaan juga mengarah pada gangguan fungsi mitokondria, yang semakin memperburuk kondisi sarcopenia. Mitochondria memiliki peran utama dalam produksi energi otot melalui fosforilasi oksidatif. Namun, pada proses penuaan, terjadi ketidakseimbangan dalam dinamika mitokondria, yang menyebabkan kerusakan DNA mitokondria. Hal ini, bersama dengan penurunan fungsi mitokondria, mengarah pada peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang memperburuk stres oksidatif dan berkontribusi pada kerusakan otot.

Secara konseptual, mekanisme molekuler yang telah dijelaskan di atas merupakan bagian dari proses penuaan sistemik yang berkontribusi terhadap terjadinya sarcopenia. Disfungsi mitokondria, peningkatan stres oksidatif, serta inflamasi kronis (inflamm-aging) merupakan komponen utama dalam proses ini. Gambaran umum mekanisme penuaan yang berkontribusi terhadap sarcopenia ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Mekanisme Penuaan yang Berkontribusi pada Sarcopenia³⁴

Myostatin telah terbukti berperan sebagai pro-oksidan, memicu pembentukan ROS dalam otot rangka melalui pensinyalan Smad2/3 dan jalur NF-κB, yang akhirnya meningkatkan kadar ligase E3 ubiquitin MuRF1 dan atrogin1. Proses ini memperburuk degradasi protein otot, menyebabkan sarcopenia semakin berkembang. Selain itu, myostatin juga dapat menurunkan aktivitas mitofagi yang efisien, yang mengarah pada akumulasi mitokondria yang rusak dan akhirnya menyebabkan apoptosis sel otot³⁴.

2.2.4 Proses Degenerasi dan Regenerasi Otot Skeletal

Regenerasi otot adalah proses multi-fase yang dimulai dari fase inflamasi dan pembersihan (fagositosis debris oleh makrofag), diikuti aktivasi dan proliferasi satelit sel, diferensiasi myoblast, fusi myotube, dan remodelling matriks ekstraseluler. Keberhasilan tiap fase bergantung pada koordinasi sinyal parakrin, suplai vaskular, dan status nutrisi/hormon. Gangguan di salah satu fase dapat menurunkan efektivitas regenerasi dan mempercepat kehilangan fungsi.

2.2.5. Model Sarcopenia pada Hewan (Induksi Dexamethasone)

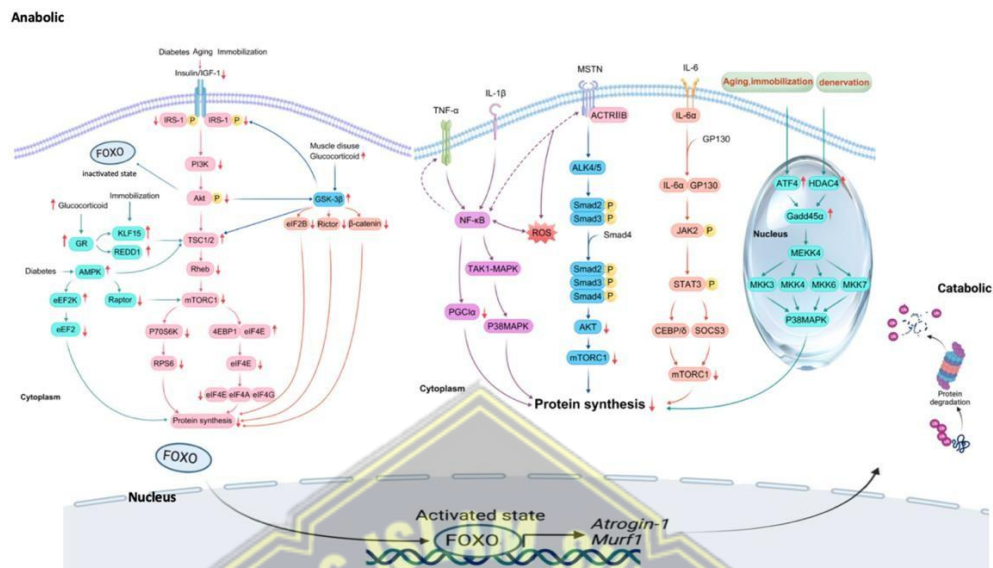
Sarcopenia, yang ditandai dengan penurunan massa otot dan fungsi otot seiring bertambahnya usia, merupakan masalah kesehatan yang signifikan, terutama pada populasi lansia. Untuk memahami mekanisme yang mendasari sarcopenia dan mengeksplorasi potensi terapi, model hewan sering digunakan, salah satunya adalah model yang diinduksi menggunakan dexamethasone. Dexamethasone adalah glukokortikoid sintetis yang diketahui memiliki efek katabolik yang kuat pada otot rangka. Pemberian dexamethasone pada hewan percobaan, seperti mencit, menyebabkan perubahan morfologi dan fungsi otot yang mencerminkan aspek-aspek utama dari sarcopenia pada manusia.

Myostatin, sebagai penghambat pertumbuhan otot, berperan penting dalam regulasi massa otot. Penelitian menunjukkan bahwa myostatin dapat merangsang pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) pada otot rangka,

yang berkontribusi pada stres oksidatif dan kerusakan³⁵. Myostatin mempengaruhi proses biogenesis mitokondria dan pembelahan mitokondria dengan mengatur kadar DRP1 dan Fis1, yang memperburuk ketidakseimbangan antara pembentukan dan degradasi protein otot³⁶. Dalam model mencit yang diinduksi dexamethasone, efek myostatin ini diperburuk, karena dexamethasone memicu peningkatan kadar myostatin yang lebih tinggi pada otot rangka dan selanjutnya meningkatkan produksi ROS.

Peningkatan ROS dapat mengaktifkan jalur pensinyalan inflamasi, termasuk TNF- α dan NF- κ B, yang berperan dalam penghancuran protein otot melalui jalur proteasomal. Pemberian dexamethasone pada hewan percobaan menyebabkan peningkatan kadar TNF- α , yang merangsang kadar myostatin dan memperburuk proses katabolik otot. Stimulasi ini akhirnya mengarah pada penurunan massa otot dan berkontribusi pada fenomena sarcopenia yang dapat diamati pada model hewan. Peningkatan TNF- α juga mengaktifkan proses katabolik lainnya dengan menstimulasi ligase E3 otot spesifik seperti MuRF-1 dan atrogin1, yang berperan dalam degradasi protein otot³⁷.

Mekanisme yang lebih rinci menunjukkan bahwa myostatin dan TNF- α bekerja dalam sebuah lingkaran umpan balik yang memperburuk kerusakan otot. Dexamethasone meningkatkan produksi myostatin dan memicu produksi ROS melalui jalur Smad2/3, dan NF- κ B. Proses ini mengarah pada stres oksidatif yang lebih tinggi dan peningkatan kerusakan otot, yang akhirnya mengarah pada penurunan fungsi otot³⁸.



Gambar 2.3 Mekanisme molekuler atrofi otot akibat glukokortikoid.³⁷

2.3. Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α)

2.3.1. Definisi dan Struktur TNF-α

Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α) adalah sitokin pro-inflamasi yang berperan krusial dalam respons imun tubuh. Sitokin ini terutama diproduksi oleh makrofag, namun juga dapat disekresikan oleh berbagai jenis sel lainnya, termasuk sel otot, adiposit, dan sel dendritik. TNF-α berfungsi sebagai mediator utama dalam pengaturan peradangan dan terlibat dalam berbagai proses biologis, seperti proliferasi sel, diferensiasi, serta kematian sel atau apoptosis³⁹. TNF-α pertama kali ditemukan pada tahun 1975 oleh Carswell et al., yang meneliti zat yang dapat menyebabkan nekrosis tumor pada hewan percobaan⁴⁰.

Secara struktural, TNF- α adalah protein kecil (~17 kDa) yang terdiri dari sekitar 157 asam amino dan memiliki bentuk trimer. Struktur ini memungkinkan TNF- α untuk berikatan dengan dua reseptor utama yang ada pada permukaan sel, yaitu TNFR1 (p55) dan TNFR2 (p75)⁴¹. Kedua reseptor ini berfungsi dalam aktivasi jalur pensinyalan yang mempengaruhi berbagai proses seluler, seperti proliferasi, diferensiasi, dan kematian sel.

2.3.2. Mekanisme Katabolik TNF- α

TNF- α berfungsi sebagai mediator utama dalam peradangan dan sangat terkait dengan atrofia otot pada kondisi seperti sarcopenia, obesitas, dan kondisi inflamasi lainnya.

TNF- α memainkan peran sentral dalam mengatur keseimbangan antara proses anabolik dan katabolik. Aktivasi TNF- α mengarah pada peningkatan kadar MuRF-1 dan Atrogin-1, dua gen yang mengkode E3 ubiquitin ligase, yang bertanggung jawab untuk degradasi protein otot melalui jalur ubiquitin-proteasome. Jalur ini merusak struktur kontraktile otot, yang menyebabkan penurunan massa otot dan kekuatan⁴².

TNF- α juga menghambat jalur anabolik seperti PI3K/Akt/mTOR, yang penting untuk sintesis protein otot. Aktivasi jalur ini oleh TNF- α menghambat proliferasi sel satelit otot, yang berperan dalam regenerasi dan perbaikan jaringan otot setelah cedera atau stres. Dengan kata lain, TNF- α tidak hanya meningkatkan degradasi protein, tetapi juga mengurangi kemampuan otot

untuk memperbaiki diri setelah kerusakan, sehingga memperburuk kondisi sarcopenia⁴³.

2.3.3. Fungsi TNF- α dalam Peradangan dan Katabolisme Otot

TNF- α memiliki peran kunci dalam regulasi peradangan dan katabolisme otot. Sebagai sitokin pro-inflamasi, TNF- α berfungsi untuk mengkoordinasikan respons imun tubuh terhadap berbagai faktor, termasuk infeksi dan cedera. Namun, pada kondisi patologis seperti sarcopenia, TNF- α juga berkontribusi pada kerusakan otot melalui proses inflamasi yang berkepanjangan.

Inflamasi kronis, yang disebabkan oleh peningkatan TNF- α , juga dapat mempengaruhi metabolisme otot dengan meningkatkan pengeluaran energi dan merangsang lipolisis di jaringan adiposa⁴⁴. Proses ini memicu perubahan negatif pada metabolisme otot, berkontribusi pada hilangnya massa otot dan peningkatan ketegangan jaringan ikat, yang memperburuk atrofi otot pada pasien dengan kondisi seperti obesitas atau penuaan.

2.3.4. TNF- α pada Model Sarcopenia

Pada model sarcopenia yang diinduksi oleh glukokortikoid seperti dexamethasone, TNF- α terbukti memperburuk kerusakan otot dengan mengurangi sintesis protein otot dan meningkatkan penguraian serat otot. Peningkatan kadar TNF- α pada model ini berhubungan langsung dengan penurunan ukuran serat otot tipe II dan penurunan kekuatan otot, yang

menggambarkan bagaimana TNF- α berperan dalam proses katabolik yang terjadi selama sarcopenia⁴⁵.

Pentingnya TNF- α dalam proses katabolisme otot juga terlihat pada penelitian yang menguji efek inhibitor TNF- α . Penghambatan TNF- α dengan penggunaan antibodi monoklonal seperti infliximab telah terbukti mengurangi inflamasi sistemik dan meningkatkan massa otot serta fungsi otot pada model hewan yang mengalami cedera atau atrofi⁴⁶. Hal ini memberikan bukti bahwa TNF- α merupakan target terapeutik yang menjanjikan untuk mengatasi gangguan otot terkait inflamasi.

2.4. Myostatin

2.4.1. Definisi dan Struktur Myostatin

Myostatin, atau dikenal juga dengan nama *Growth Differentiation Factor 8* (GDF-8), adalah protein biologis yang berfungsi sebagai penghambat utama dalam pertumbuhan otot. Sebagai anggota keluarga *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β), myostatin memainkan peran penting dalam pengaturan massa otot tubuh.³⁷

Secara struktur, myostatin adalah protein homodimer yang terdiri dari dua subunit yang terhubung oleh ikatan disulfida. Struktur ini sangat mirip dengan anggota lain dalam keluarga TGF- β , seperti activin, *bone morphogenetic proteins* (BMPs), dan TGF- β s lainnya, yang juga berfungsi dalam pengaturan pertumbuhan sel. Struktur myostatin terdiri dari beberapa domain penting yang memungkinkannya berfungsi secara efektif dalam

mengatur pertumbuhan otot. Salah satu domain utama adalah domain sinyal (*signal peptide*), yang berfungsi untuk mengirimkan protein ini ke luar sel tempat ia diproduksi. Setelah diproduksi, myostatin diproses dan aktif dalam bentuk matang yang dapat berikatan dengan reseptor pada permukaan sel otot. Selain domain sinyal, myostatin juga memiliki domain propeptida, yang diperlukan untuk aktivasi protein tersebut. Propeptida ini berfungsi untuk mencegah aktivasi myostatin sebelum ia mencapai bentuk yang aktif, dengan demikian memastikan bahwa protein ini hanya aktif setelah proses pematangan dan pemrosesan yang tepat.⁴⁷

2.4.2. Fungsi Myostatin sebagai Regulator Negatif Pertumbuhan Otot

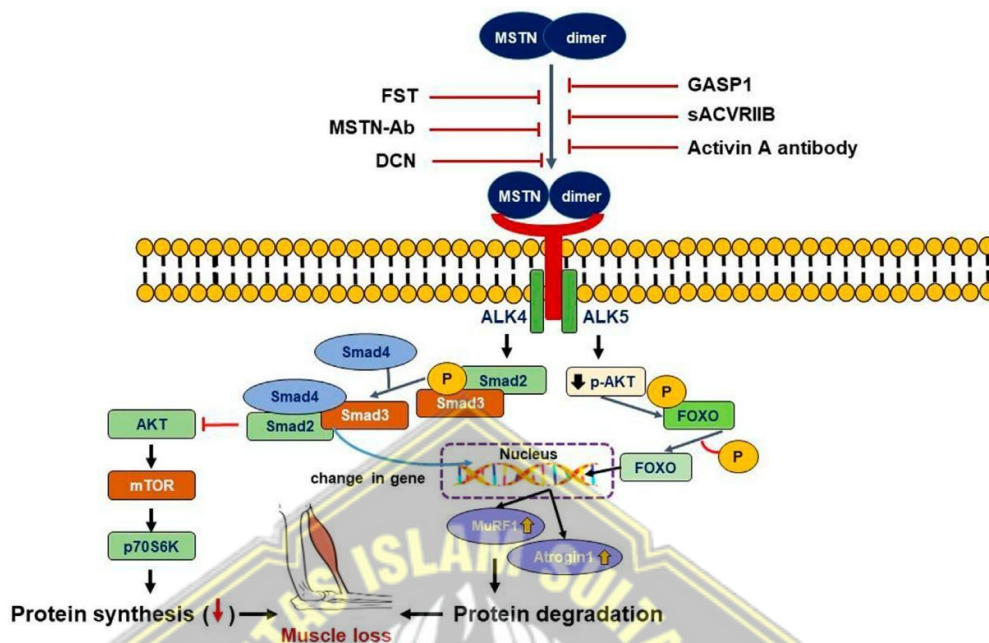
Myostatin bekerja sebagai regulator negatif, menghambat proliferasi dan diferensiasi sel otot, sehingga berfungsi untuk mencegah pertumbuhan otot yang berlebihan dan menjaga ukuran otot agar tetap dalam batas yang normal. Secara spesifik, myostatin menghambat proses proliferasi dan diferensiasi sel otot, yang pada akhirnya mengontrol pertumbuhan dan pemeliharaan otot dalam tubuh. Protein ini memiliki peran yang sangat penting dalam pembentukan dan pengaturan massa otot tubuh, dengan menghambat proses proliferasi dan diferensiasi sel otot. Myostatin berfungsi untuk mencegah pertumbuhan otot yang berlebihan, menjaga agar pertumbuhan otot tetap dalam batas yang normal dan terkontrol.⁴⁷

Dalam konteks fungsional, myostatin bekerja dengan cara menghambat proses pertumbuhan dan perkembangan otot melalui pengaturan jalur sinyal

tertentu. Secara biologis, myostatin ditemukan di jaringan otot rangka, serta berbagai jaringan tubuh lainnya, di mana ia berperan untuk mencegah otot berkembang melebihi batas yang normal. Ketika aktivitas myostatin terganggu atau berkurang, dapat menyebabkan peningkatan massa otot yang luar biasa, suatu fenomena yang terlihat pada hewan dengan mutasi gen myostatin, seperti sapi yang mengalami kondisi "*double muscling*" (otot ganda) yang lebih besar dari ukuran otot normal.^{37,47}

2.4.4. Mekanisme Katabolik Myostatin melalui Jalur Smad2/3

Setelah diproduksi, myostatin (MSTN) berikatan dengan reseptor serine/threonine kinase jenis II, yaitu ActRIIB (*Activin Receptor Type IIB*), yang kemudian berinteraksi dengan reseptor jenis I seperti ALK4 (*Activin Receptor-Like Kinase 4*) atau ALK5. Kompleks reseptor ini mengaktifkan jalur sinyal intraseluler melalui protein Smad2/3, yang berperan dalam penghambatan proliferasi dan diferensiasi sel otot. Aktivasi jalur ini mengarah pada pengurangan massa otot dan mencegah pertumbuhan otot yang berlebihan. Proses ini berfungsi untuk mengontrol pertumbuhan otot dan mencegah hipertrofi yang tidak terkontrol, dengan mengarahkan perubahan transkripsi gen di inti sel yang memicu aktivasi gen penanda atrofi otot, seperti MuRF1 dan Atrogin1, yang pada akhirnya mengakibatkan hilangnya massa otot.^{47,48}



Gambar 2.4 Jalur Pensinyalan Myostatin^{47,48}

2.4.3. Myostatin pada Kondisi Sarcopenia dan Atrofi Otot

Salah satu faktor utama yang berkontribusi pada perkembangan sarcopenia adalah peningkatan aktivitas myostatin, yang berfungsi sebagai penghambat pertumbuhan otot. Pada kondisi normal, myostatin berperan untuk menjaga keseimbangan massa otot dengan mengatur proses sintesis dan degradasi protein otot. Namun, pada individu yang lebih tua, kadar myostatin cenderung meningkat, yang mengarah pada penghambatan pembentukan otot baru dan mempercepat proses katabolisme otot. Hal ini disebabkan oleh penurunan kemampuan tubuh untuk mengatur respons terhadap latihan fisik dan regenerasi otot. Peningkatan myostatin yang berlebihan pada sarcopenia

memperburuk degradasi massa otot, yang pada gilirannya mempercepat proses atrofi otot.

Peningkatan kadar myostatin mengarah pada aktivasi jalur pensinyalan Smad2/3 yang berujung pada ekspresi gen-gen yang terlibat dalam proses katabolisme otot, seperti MuRF1 dan Atrogin-1, yang memicu degradasi protein otot melalui jalur ubiquitin-proteasome. Akibatnya, otot tidak dapat tumbuh atau memperbaiki diri dengan efektif, menyebabkan penurunan kekuatan dan massa otot.³²

2.5. *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs)

2.5.1. Definisi dan Karakteristik MSCs

Mesenchymal stem cells (MSCs), atau sel punca mesenkimal, adalah sel multipoten yang memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel spesifik, termasuk sel-sel dalam jaringan otot, tulang, kartilago, dan adiposa.⁴⁹ MSCs merupakan salah satu tipe sel punca yang paling banyak diteliti karena kemampuannya untuk beradaptasi dalam berbagai kondisi fisiologis dan patologis.

MSCs memiliki beberapa karakteristik utama, antara lain kemampuan untuk berproliferasi dalam jumlah besar tanpa kehilangan potensi diferensiasi, serta kemampuan untuk beradaptasi dan berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel tergantung pada lingkungan dan sinyal yang diterima.⁴⁹ Salah satu ciri khas MSCs adalah ekspresi marker permukaan seperti CD73, CD90, dan CD105, sementara tidak mengekspresikan marker hematopoietik

seperti CD34 dan CD45, yang membedakan MSCs dari sel punca hematopoietik.⁵⁰ Selain kemampuan diferensiasi, MSCs juga memiliki kemampuan untuk memperbaiki jaringan yang rusak, mengatasi peradangan, dan mendukung regenerasi jaringan.⁵¹

2.5.2. Sumber MSCs dan Potensi Terapeutiknya

MSCs dapat ditemukan di berbagai jaringan tubuh, termasuk sumsum tulang, darah tali pusat, lemak, dan jaringan otot. Sumber utama MSCs dalam penelitian klinis adalah sumsum tulang, di mana sel-sel ini pertama kali diidentifikasi, tetapi karena keterbatasan pengambilan sumsum tulang, MSCs dari sumber lain, seperti jaringan adiposa dan darah tali pusat, juga menjadi alternatif yang populer.⁴⁹

MSCs dari darah tali pusat dan jaringan adiposa memiliki keuntungan dibandingkan dengan sumsum tulang, yaitu lebih mudah diisolasi dan lebih banyak tersedia, serta menunjukkan potensi untuk regenerasi yang lebih tinggi. Selain itu, MSCs ini juga menunjukkan kemampuan untuk menghindari respons imun yang kuat karena sifat imunomodulasi mereka, yang membuatnya ideal untuk terapi allogenik (menggunakan donor dari individu lain).⁵²

Dalam konteks terapeutik, MSCs menunjukkan potensi untuk digunakan dalam berbagai terapi regeneratif. Mereka telah digunakan dalam pengobatan penyakit degeneratif, luka, gangguan jantung, dan penyakit autoimun. MSCs dapat membantu memperbaiki kerusakan jaringan melalui

diferensiasi seluler dan mengatur respons imun tubuh. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa MSCs dapat mempercepat penyembuhan tulang patah, memodulasi respon inflamasi pada penyakit autoimun, dan bahkan memiliki potensi untuk digunakan dalam terapi kanker dan penyakit jantung.⁵³

2.5.3. Mekanisme Imunomodulasi dan Regenerasi oleh MSCs

MSCs memiliki kemampuan imunomodulasi yang berguna dalam terapi penyakit yang melibatkan peradangan kronis atau respons imun yang berlebihan, seperti dalam kasus penyakit autoimun atau transplantasi organ. Mereka dapat mengatur aktivitas sistem imun melalui interaksi langsung dengan sel imun atau melalui sekresi molekul yang memodulasi respons imun. MSCs dapat menghambat aktivasi sel T, mengatur aktivitas sel B, dan menurunkan produksi sitokin inflamasi. Mereka juga dapat merangsang sel dendritik untuk mengubah respon imun terhadap antigen yang lebih toleran, yang sangat penting dalam terapi transplantasi untuk mengurangi penolakan organ. Selain imunomodulasi, MSCs juga dapat meningkatkan regenerasi jaringan melalui diferensiasi dan produksi faktor pertumbuhan yang mendorong perbaikan jaringan yang rusak.⁵⁴

MSCs dapat berinteraksi dengan mikro lingkungan jaringan yang rusak, mengaktifkan jalur regeneratif melalui sekresi faktor pertumbuhan dan sitokin. MSCs merangsang proliferasi sel dan diferensiasi sel yang diperlukan untuk perbaikan jaringan dan pemulihan fungsi organ dengan mengaktifkan jalur seperti Wnt, Notch, dan TGF- β .⁵⁵

2.6. *Secretome Hypoxia-MSCs* (SH-MSCs)

2.6.1. Definisi dan Komponen Bioaktif dalam SH-MSCs

Secretome Hypoxia-MSCs (SH-MSCs) merujuk pada sekresi molekul yang dikeluarkan oleh MSCs yang telah terpapar pada kondisi hipoksia (kekurangan oksigen). Hipoksia merupakan kondisi lingkungan yang umum di berbagai jaringan tubuh yang rusak atau terluka, dan ini telah diakui dapat memodulasi aktivitas MSCs. Ketika MSCs berada dalam kondisi hipoksia, mereka akan merespons dengan meningkatkan sekresi faktor-faktor bioaktif yang penting untuk proses regenerasi dan perbaikan jaringan.

Komponen utama dalam SH-MSCs meliputi berbagai molekul seperti sitokin, faktor pertumbuhan, mikroRNA, dan lipid. Beberapa faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh SH-MSCs termasuk VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*), HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), dan IGF (*Insulin-Like Growth Factor*). Molekul-molekul ini memainkan peran penting dalam meningkatkan angiogenesis (pembentukan pembuluh darah baru), memperbaiki jaringan, dan mengurangi peradangan. MikroRNA yang dikeluarkan oleh SH-MSCs juga berfungsi untuk mengatur ekspresi gen yang terkait dengan regenerasi dan perbaikan otot serta pembaruan sel-sel yang rusak. Sebagai contoh miR-146a dengan menurunkan kadar protein IRAK1 dan TRAF6 menyebabkan

melemahnya sinyal yang mengaktivasi NF- κ B sehingga mengurangi produksi TNF- α .⁵⁶

Eksosom MSC juga mengandung miR 27a dan 27b yang menurunkan kadar myostatin melalui pengikatan ke 3'UTR (3' Untranslated Region) mRNA myostatin pada model hewan yang menderita sarcopenia.

2.6.2. Pengaruh Kondisi Hipoksia terhadap Profil *Secretome*

Kondisi hipoksia telah terbukti mengubah profil *secretome* MSCs, meningkatkan ekspresi faktor-faktor yang mendukung perbaikan jaringan dan pengaturan respons imun. Hipoksia merangsang MSCs untuk mengaktifkan jalur pensinyalan yang dikendalikan oleh faktor transkripsi seperti HIF-1 α (*Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*), yang mempengaruhi ekspresi gen yang terlibat dalam angiogenesis, perbaikan jaringan, dan respons terhadap stres oksidatif.⁸

Penelitian menunjukkan bahwa dalam kondisi hipoksia, MSCs meningkatkan sekresi molekul yang meningkatkan migrasi sel, proliferasi, dan diferensiasi. Salah satu efek utama dari hipoksia pada *secretome* MSCs adalah peningkatan sekresi VEGF, yang memfasilitasi pembentukan pembuluh darah baru dan meningkatkan suplai oksigen ke jaringan yang rusak. Selain itu, hipoksia juga meningkatkan sekresi TGF- β dan bFGF, yang mendukung regenerasi otot dan jaringan lainnya.⁵⁷

2.6.3. Mekanisme Kerja SH-MSCs pada Regenerasi Otot Skeletal

Regenerasi otot skeletal adalah proses kompleks yang melibatkan berbagai faktor pertumbuhan, sel punca, dan mikro lingkungan jaringan. SH-MSCs memainkan peran penting dalam mendukung proses regenerasi otot melalui beberapa mekanisme, yang sebagian besar didorong oleh sekresi komponen bioaktif dalam *secretome* mereka.

Setelah cedera otot, SH-MSCs akan mengeluarkan VEGF, IGF-1, dan HGF, yang semuanya berkontribusi pada proses perbaikan otot. VEGF mendukung angiogenesis dan meningkatkan suplai oksigen ke jaringan otot yang rusak, sementara IGF-1 dan HGF merangsang proliferasi dan diferensiasi sel otot, serta memfasilitasi perbaikan jaringan yang rusak.⁵⁷

Selain faktor-faktor pertumbuhan, SH-MSCs juga mengeluarkan sitokin anti-inflamasi yang mengurangi peradangan di area cedera, memungkinkan pemulihan jaringan otot yang lebih cepat. SH-MSCs juga mengandung mikroRNA yang berfungsi dalam regulasi *post-translational* terhadap ekspresi gen yang terkait dengan regenerasi otot dan mengatur proses-proses katabolik yang dapat memperlambat pemulihan jaringan.

Pengaruh SH-MSCs terhadap TNF- α dimulai dengan kemampuan MSCs untuk mengubah respons imun dalam tubuh, terutama ketika terpapar pada kondisi hipoksia. Hipoksia memicu MSCs untuk melepaskan berbagai faktor imunomodulator, termasuk TGF- β dan IL-10, yang bekerja untuk menghambat aktivitas sel-sel imun yang menghasilkan sitokin pro-inflamasi

seperti TNF- α . TGF- β , khususnya, berperan sebagai pengatur utama dalam menurunkan produksi TNF- α dengan mengurangi aktivasi sel T dan sel B yang memicu peradangan. Selain itu, HGF yang dikeluarkan oleh SH-MSCs menghambat jalur pensinyalan NF- κ B, jalur utama yang mengatur produksi TNF- α dalam sel-sel imun. Dengan menurunkan kadar TNF- α , SH-MSCs dapat mengurangi peradangan yang berlebihan, yang pada gilirannya mempercepat proses pemulihan otot yang rusak dan mendukung regenerasi jaringan secara lebih efisien.^{58,59}

Pengaruh SH-MSCs terhadap kadar myostatin juga sangat signifikan dalam mendukung regenerasi otot. Myostatin, yang dikenal sebagai inhibitor utama dalam pertumbuhan otot, bekerja dengan cara menghambat proliferasi dan diferensiasi sel otot, sehingga membatasi kemampuan tubuh untuk memperbaiki dan membangun kembali jaringan otot yang rusak. Ketika MSCs terpapar pada hipoksia, mereka meningkatkan sekresi IGF-1 dan HGF, dua faktor pertumbuhan yang tidak hanya mendukung perbaikan otot tetapi juga secara langsung menurunkan ekspresi myostatin. IGF-1, melalui jalur pensinyalan mTOR, merangsang sintesis protein otot dan menghambat aktivitas myostatin, yang pada akhirnya meningkatkan pertumbuhan dan regenerasi otot. HGF juga berperan dalam merangsang proliferasi sel otot dan memodulasi mikro lingkungan otot, mengurangi efek penghambatan yang diberikan oleh myostatin. Dengan cara ini, SH-MSCs tidak hanya mempercepat pemulihan otot yang rusak, tetapi juga meningkatkan

pembentukan massa otot baru, menjadikannya terapi yang sangat efektif dalam mengatasi kondisi yang melibatkan atrofi otot atau penurunan massa otot.⁶⁰

2.6.4. Kelebihan *Secretome* dibandingkan Terapi Sel Utuh

Terapi berbasis SH-MSCs menawarkan beberapa kelebihan dibandingkan terapi sel utuh, yang melibatkan transplantasi langsung MSCs ke dalam tubuh pasien. Salah satu kelebihan utama dari terapi *secretome* adalah bahwa ia tidak melibatkan pengenalan sel asing, yang dapat menimbulkan masalah terkait dengan respons imun dan penolakan sel. Dalam terapi berbasis *secretome*, hanya molekul yang dikeluarkan oleh MSCs yang digunakan, mengurangi risiko penolakan imunologis.⁶¹

Selain itu, terapi *secretome* memungkinkan pengobatan yang lebih terfokus dan terstandarisasi. Dengan menggunakan faktor-faktor bioaktif yang telah dipilih secara spesifik, terapi ini dapat memberikan hasil yang lebih dapat diprediksi dan mengurangi kompleksitas pengobatan. *Secretome* juga memiliki potensi untuk digunakan dalam terapi berbasis *cell-free*, yang lebih mudah diterima oleh pasien dan lebih mudah diproduksi dalam skala besar.⁶¹

SH-MSCs juga memiliki potensi lebih besar untuk meningkatkan pemulihan jaringan karena dapat menargetkan beberapa jalur biologis sekaligus, mengurangi peradangan, meningkatkan regenerasi sel, dan mempercepat penyembuhan jaringan yang rusak. Dalam banyak kasus, terapi

secretome dapat menghasilkan perbaikan yang lebih cepat dan lebih efisien tanpa memerlukan pemeliharaan atau proliferasi sel dalam tubuh.⁶¹

2.7. Dexamethasone (DEX)

Dexamethasone adalah salah satu jenis glukokortikoid sintetis yang digunakan sebagai obat anti-inflamasi dan imunosupresan untuk berbagai kondisi medis, termasuk penyakit autoimun, alergi, dan gangguan inflamasi. Obat ini bekerja dengan cara menekan respon imun tubuh dan mengurangi inflamasi melalui penghambatan biosintesis prostaglandin dan produksi sitokin pro-inflamasi.⁶²

Pada atrofi otot, dexamethasone memiliki efek yang sangat signifikan, yaitu dapat mempercepat proses penghancuran otot (katabolisme). Penggunaan jangka panjang atau dosis tinggi dexamethasone dapat menyebabkan atrofi otot dengan menginduksi peningkatan ekspresi gen-gen katabolik seperti MuRF-1 (*muscle ring-finger protein 1*) dan MAFbx (*muscle atrophy F-box protein*), yang berperan dalam degradasi protein otot.⁶³ Dexamethasone juga meningkatkan kadar TNF- α , sitokin pro-inflamasi yang mengaktifkan jalur NF- κ B, yang lebih lanjut merangsang ekspresi gen-gen katabolik dan menghambat sintesis protein otot. Selain itu, dexamethasone mengurangi aktivitas sel satelit otot, yang bertanggung jawab untuk regenerasi dan perbaikan jaringan otot yang rusak.⁴²

Efek dari dexamethasone pada otot sangat tergantung pada durasi dan dosis pemberian. Dalam jangka panjang, penggunaan dexamethasone dapat

mengarah pada kerusakan otot yang parah, yang seringkali diiringi dengan penurunan massa otot dan kekuatan fisik, yang menjadi dasar dari perkembangan sarcopenia pada individu yang mendapat pengobatan glukokortikoid jangka panjang.^{11,64} Oleh karena itu, meskipun dexamethasone sangat bermanfaat untuk pengobatan berbagai kondisi medis, dampaknya terhadap otot harus dipertimbangkan dengan hati-hati untuk menghindari terjadinya atrofi otot yang signifikan.



BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS

3.1 Kerangka Teori

Sarcopenia adalah kondisi degeneratif yang ditandai oleh penurunan massa, kekuatan, dan fungsi otot. Pada model eksperimental, paparan glukokortikoid seperti dexamethasone memicu stres oksidatif dan inflamasi sistemik yang mengaktifkan jalur katabolik otot, yang ditandai dengan peningkatan kadar gen atrogen-1, MuRF-1, serta peningkatan myostatin yang mempercepat proteolisis protein otot dan mengecilkan diameter serat otot⁴⁵. Peningkatan kadar TNF- α yang terjadi pada kondisi ini memperburuk proses inflamasi dan merangsang peningkatan kadar MuRF-1 dan Atrogen-1, yang mengarah pada degradasi protein otot melalui jalur ubiquitin-proteasome. Aktivasi jalur NF- κ B oleh TNF- α berkontribusi pada perubahan ini dengan meningkatkan kadar kedua E3 ligase ubiquitin, yang mengarahkan degradasi protein kontraktil otot⁴².

Myostatin, anggota *superfamily* TGF- β , bertindak sebagai penghambat utama pertumbuhan otot. Kadar myostatin yang meningkat pada sarcopenia berperan dalam menekan proliferasi dan diferensiasi sel satelit otot, serta menginduksi jalur Smad2/3 yang menghambat sintesis protein⁶⁵. Peningkatan kadar myostatin pada kondisi sarcopenia memperparah atrofia otot dan memperburuk kelemahan otot, karena myostatin menekan sinyal anabolik yang terkait dengan

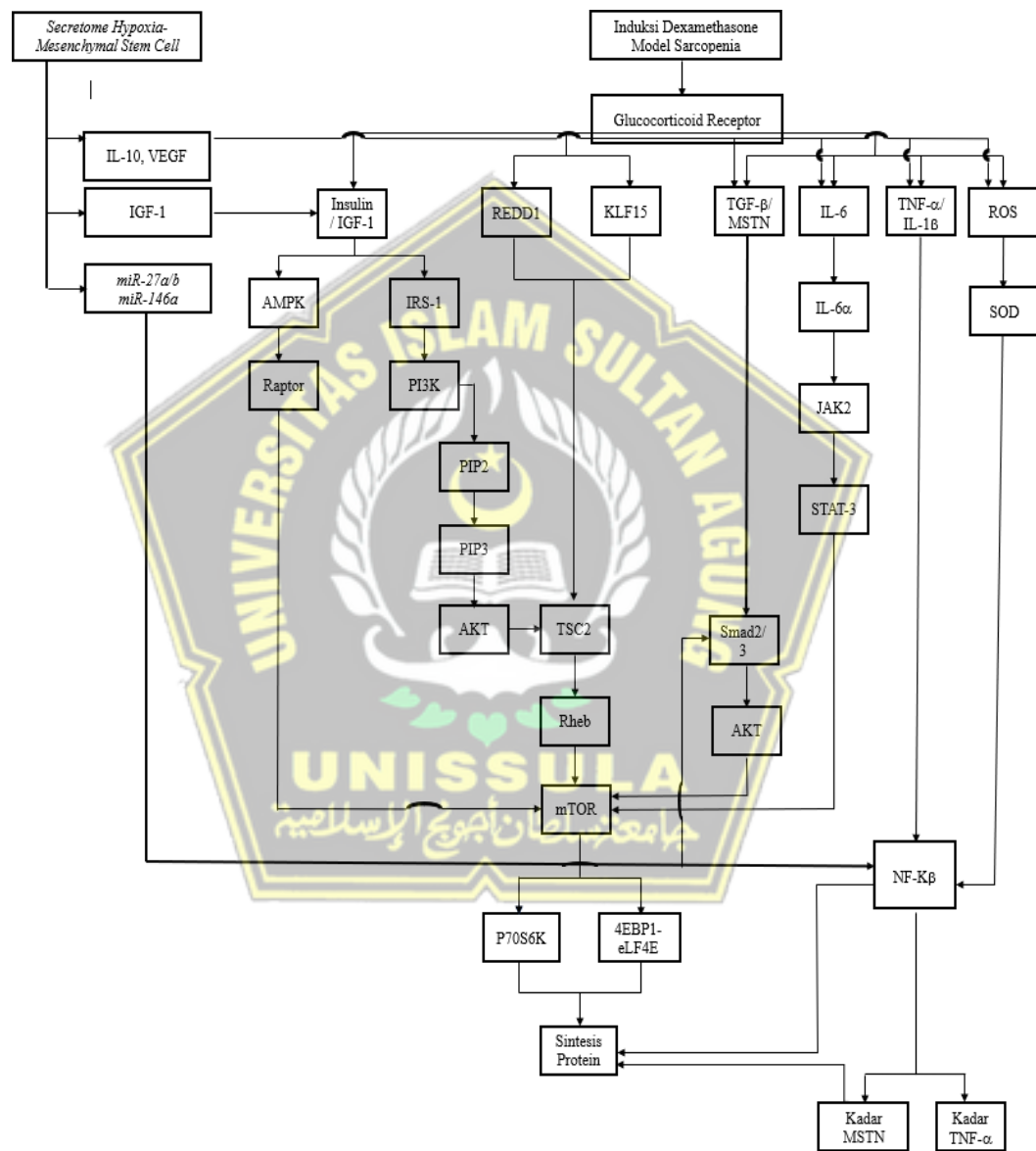
jalur IGF-1/PI3K/Akt⁶⁶. Dengan kata lain, myostatin memperburuk keseimbangan otot dengan meningkatkan dominasi jalur katabolik dan menghambat mekanisme anabolik yang diperlukan untuk regenerasi otot.

Secretome mesenchymal stem cells yang diprekondisi hipoksia (SH-MSCs) diketahui dapat meningkatkan sekresi faktor parakrin seperti IGF-1, HGF, dan VEGF, serta menurunkan kadar mediator katabolik seperti myostatin. Penelitian pra-klinis menunjukkan bahwa MSC-*secretome* atau MSC-derived extracellular vesicles (EVs) dapat memperbaiki fungsi otot melalui peningkatan aktivitas jalur PI3K–Akt, penghambatan jalur ubiquitin-proteasome, serta regulasi kadar myostatin⁵⁶. Salah satu mekanisme utama SH-MSCs dalam menurunkan kadar TNF- α adalah dengan menghambat jalur pensinyalan NF- κ B yang diaktifkan oleh TNF- α dalam respon inflamasi, sehingga mengurangi kerusakan otot akibat peradangan kronis⁵⁸. Selain itu, SH-MSCs meningkatkan sekresi interleukin-10 (IL-10), sitokin anti-inflamasi yang menghambat produksi TNF- α dan menekan aktivasi makrofag, serta merangsang jalur pensinyalan TGF- β yang mempercepat pemulihan jaringan otot⁶⁷. SH-MSCs juga meningkatkan mitofagi, yang mengurangi produksi ROS dan stres oksidatif pada sel otot, sehingga membantu menurunkan sekresi TNF- α dan memperbaiki kondisi sarcopenia.⁶⁸

SH-MSCs dapat menurunkan kadar myostatin melalui beberapa mekanisme, termasuk penghambatan jalur TGF- β /Smad dengan menurunkan aktivitas Smad2/3, yang mengarah pada peningkatan pertumbuhan otot⁶⁹. Selain itu, SH-MSCs mengatur jalur Akt/mTOR untuk meningkatkan sintesis protein otot

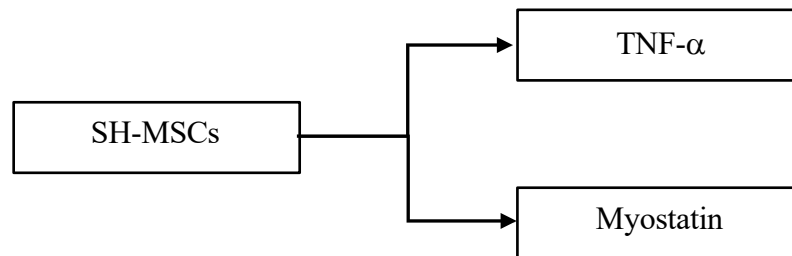
dan menekan aktivitas myostatin⁷⁰. SH-MSCs juga menghambat jalur NF- κ B yang mengaktifkan myostatin dan mempercepat katabolisme otot, serta meningkatkan faktor-faktor transkripsi seperti MyoD dan myogenin yang mendukung diferensiasi mioblas dan pembentukan otot baru⁷¹. Pemberian SH-MSCs pada model mencit sarcopenia terinduksi dexamethasone diharapkan dapat menurunkan kadar TNF- α dan menekan kadar myostatin, sehingga keseimbangan anabolik–katabolik otot dapat dipulihkan dan proses regenerasi otot dapat berjalan lebih efektif⁸.





Gambar 3.1. Kerangka Teori

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3.2. Kerangka Konsep

3.3. Hipotesis

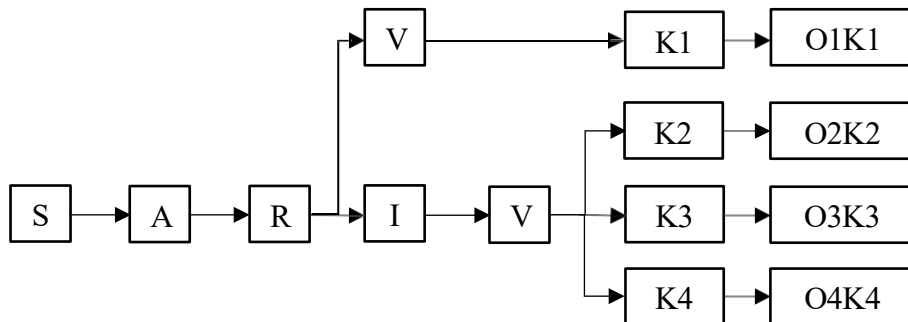
Hipotesis penelitian ini adalah terdapat pengaruh pemberian *Secretome Hypoxia Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) terhadap kadar TNF- α dan Myostatin pada Mencit Betina Galur C57BL/6 model sarcopenia yang diinduksi dexamethasone secara *in vivo*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vivo* dengan rancangan *Post-Test Only Control Group Design*. Subjek penelitian adalah Mencit Betina Galur C57BL/6 yang dibagi ke dalam lima kelompok, masing-masing terdiri atas enam ekor mencit. Kelompok perlakuan tersebut meliputi: K1 sebagai kontrol sehat (tanpa induksi dan tanpa pemberian SH-MSCs), K2 sebagai kelompok dengan induksi dexamethasone tanpa terapi (model sarcopenia), K3 sebagai kelompok dengan induksi dexamethasone dan pemberian SH-MSCs dosis 30 μ L, serta K4 sebagai kelompok dengan induksi dexamethasone dan pemberian SH-MSCs dosis 60 μ L. Pengumpulan data dilakukan setelah seluruh intervensi selesai diberikan.⁶⁹⁻⁷¹



Gambar 4.1. Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

S : Subjek Penelitian

A : Adaptasi

I : Induksi

V : Validasi

R : Randomisasi

K1 : Kontrol sehat (tanpa induksi dan tanpa SH-MSCs)

K2 : Induksi dexamethasone saja (model sarcopenia)

K3 : Induksi dexamethasone + SH-MSCs dosis sedang (30 μ L)

K4 : Induksi dexamethasone + SH-MSCs dosis tinggi (60 μ L)

O1K1 : Observasi Kadar TNF- α dan Myostatin pada kelompok 1

O2K2 : Observasi Kadar TNF- α dan Myostatin pada kelompok 2

O3K3 : Observasi Kadar TNF- α dan Myostatin pada kelompok 3

O4K4 : Observasi Kadar TNF- α dan Myostatin pada kelompok 4

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel yang digunakan mencit C57BL/6 yang diperoleh dari *Animal Research Center, Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Indonesia, yaitu mencit betina galur C57BL/6 berusia 8-12 minggu dengan berat badan 30 – 35 gram. Pemilihan mencit betina galur C57BL/6 sebagai hewan uji dalam penelitian ini didasarkan pada kesesuaian fisiologis dan genetiknya terhadap manusia, serta konsistensinya dalam penelitian biomedis, khususnya yang berkaitan dengan sistem muskuloskeletal.³⁷

Mencit C57BL/6 memiliki tingkat homologi genetik terhadap manusia mencapai 99% dan kesamaan fisiologi otot serta sistem metabolik yang tinggi, sehingga banyak digunakan sebagai model standar untuk mempelajari mekanisme molekuler penyakit degeneratif termasuk Sarcopenia. Selain itu, strain ini memiliki respons biologis yang stabil terhadap intervensi farmakologis maupun genetik, serta mudah dikontrol dalam kondisi laboratorium yang terstandar.³⁷

Pemilihan jenis kelamin betina dilakukan untuk memperoleh model yang lebih stabil terhadap variabilitas metabolik dan inflamasi. Estrogen pada mencit betina memiliki efek protektif terhadap stres oksidatif dan inflamasi jaringan otot, dua faktor penting yang berperan

dalam patogenesis Sarcopenia. Studi menunjukkan bahwa hormon ini mampu menekan hipertrofi adiposit dan inflamasi pada jaringan otot, sehingga mencit betina memberikan baseline yang lebih seragam dibandingkan mencit jantan pada model Sarcopenia yang diinduksi secara kimiawi.³⁷

Usia hewan yang digunakan adalah 8–12 minggu (setara dengan mencit berumur ± 3 bulan), yang merepresentasikan fase dewasa muda (*young adult*). Pada usia ini, sistem muskuloskeletal mencit telah matang secara fisiologis, namun belum mengalami perubahan degeneratif akibat penuaan, sehingga hasil pengukuran massa otot dan fungsi kontraktil tidak dipengaruhi oleh proses pertumbuhan maupun penurunan usia. Pemilihan usia ini juga konsisten dengan penelitian Wang *et al.* (2023) yang menggunakan mencit C57BL/6 betina berumur 3 bulan sebagai kelompok perlakuan model Sarcopenia akibat paparan dexamethasone.^{1,12,37}

Rentang berat badan 30–35 gram dipilih karena merupakan kisaran normal untuk mencit betina C57BL/6 dewasa muda. Berat yang relatif homogen sangat penting untuk memastikan konsistensi dosis induksi, mengingat dexamethasone diberikan berdasarkan bobot tubuh (20 mg/kgBB). Rentang berat ini juga mencerminkan kondisi fisiologis sehat tanpa kelebihan lemak atau defisit massa otot yang dapat menjadi faktor perancu terhadap hasil penelitian.^{1,12,37}

4.2.2. Besar Sampel

Jumlah hewan uji yang digunakan pada penelitian ditentukan berdasarkan rumus Federer $(t - 1)(r - 1) \geq 15$, sebagai berikut:

$$4(r - 1) \geq 15$$

$$r - 1 \geq 3,75$$

$$r \geq 4,75 \approx 5$$

Keterangan :

t= jumlah perlakuan

r= jumlah minimal hewan uji pada tiap perlakuan.

Jumlah sampel dalam penelitian ini berdasarkan rumus Federer 6 ekor per kelompok ditambah 10% cadangan (2 ekor) maka per kelompok berisi 8 ekor mencit. Kemudian 4 ekor tambahan untuk validasi makroskopis dan histologi. Secara keseluruhan, penelitian ini menggunakan 36 ekor mencit C57BL/6 yang dibagi menjadi:

1. 10 ekor mencit betina C57BL/6 dipilih secara acak. 2 ekor untuk validasi mencit sehat tanpa induksi dexamethasone dan 8 ekor untuk dijadikan kelompok kontrol sehat (K1) atau tanpa induksi dan perlakuan.
2. 26 ekor mencit betina C57BL/6 lain nya dilakukan induksi dexamethasone 20mg/kgBB i.p selama 10 hari, kemudian

secara acak di ambil 2 ekor mencit betina C57BL/6 untuk validasi pasca induksi. dan 24 ekor mencit betina C57BL/6 sisanya di kelompokkan menjadi 3 kelompok dengan masing-masing kelompok berjumlah 8 ekor. dengan ketentuan sebagai berikut:

1. Satu kelompok model Sarcopenia dengan induksi dexamethasone tanpa terapi (K2)
2. 2 kelompok model Sarcopenia dengan induksi dexamethasone dan diberikan perlakuan pemberian SH- MSCs pada variasi dosis (30 μ L dan 60 μ L)

Sampel dengan Jumlah ini sudah memenuhi kriteria Federer dan memberikan kekuatan analisis yang cukup untuk uji statistik.⁷²

4.2.3. Cara Pengambilan Sampel Penelitian

Penelitian ini menerapkan metode *simple random sampling* dalam pemilihan sampel. Sebanyak 36 ekor mencit betina galur C57BL/6 yang sudah dipisahkan dari 4 ekor mencit untuk validasi, yang memenuhi kriteria inklusi dibagi secara acak menjadi 4 kelompok, terdiri dari satu kelompok tanpa perlakuan, dua kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri dari 8 ekor mencit betina galur C57BL/6.

4.2.4. Kriteria Inklusi

- a. Mencit berjenis kelamin betina galur C57BL/6
- b. Umur antara 8-12 minggu
- c. Memiliki berat badan 30-35 g
- d. Mencit dalam kondisi sehat aktif, tidak cacat anatomi sebagai kontrol normal
- e. Telah melewati masa aklimatisasi selama 7 hari.

4.2.5. Kriteria Eksklusi

- a. Mencit yang gagal mengalami penurunan massa otot setelah diinduksi
- b. Mencit yang menunjukkan tanda-tanda gejala penyakit atau stres selama masa adaptasi
- c. Mencit yang memiliki luka, iritasi, atau kelainan (luka akibat perilaku/stress, luka yang mengganggu fungsi normal, luka infeksi sistemik, luka >1cm disertai pendarahan yang tidak berhenti) pada area yang diberikan perlakuan.

4.2.6. Kriteria *Drop Out*

- a. Mencit yang mati selama pelaksanaan penelitian.
- b. Mencit yang mengalami gangguan kesehatan atau sakit berat (gangguan neurologis berat, disfungsi organ vital, gangguan perilaku patologis dan infeksi sistemik yang tidak terkontrol) selama periode penelitian.

4.3. Variabel dan Definisi Operasional Penelitian

4.3.1. Variabel Penelitian

4.3.1.1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah pemberian *secretome hypoxia mesenchymal stem cells* (SH-MSCs) dengan variasi dosis 30 μ L dan 60 μ L.

4.3.1.2. Variabel Terikat

Variabel terikat adalah kadar TNF- α dan kadar Myostatin.

4.3.2. Definisi Operasional

4.3.2.1. SH-MSCs

SH-MSCs adalah *secretome* hasil kultur *mesenchymal stem cells* yang diprekondisi pada lingkungan hipoksia (kadar oksigen rendah $\leq 5\%$). *Secretome* ini terdiri dari faktor terlarut dan eksosom dengan kandungan molekul bioaktif, termasuk sitokin (IL-6, IL-10), *growth factor (IGF-1)*, dan *microRNA*, yang berperan dalam modulasi inflamasi, angiogenesis, serta regenerasi jaringan otot rangka.

Unit: Diberikan dan tidak diberikan

Skala : Nominal

4.3.2.2. Kadar TNF- α

TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*) dalam penelitian ini merujuk pada kadar sitokin proinflamasi yang terdapat pada

serum darah mencit betina galur C57BL/6 setelah induksi dexamethasone dan pemberian SH-MSCs. TNF- α berperan dalam proses inflamasi dan katabolisme otot melalui aktivasi jalur NF- κ B yang berkontribusi terhadap degradasi protein otot. Kadar TNF- α diukur secara kuantitatif menggunakan metode Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sesuai protokol kit yang digunakan. Absorbansi dibaca menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm, dan hasil dinyatakan dalam satuan ng/L berdasarkan kurva standar.

Metode : ELISA

Unit : ng/L (nanogram per liter)

Skala : Rasio

4.3.2.3. Kadar Myostatin

Myostatin dalam penelitian ini merujuk pada kadar protein regulator negatif pertumbuhan otot yang terdapat pada jaringan otot mencit betina galur C57BL/6 setelah induksi dexamethasone dan pemberian SH-MSCs. Myostatin berperan dalam proses katabolisme otot melalui aktivasi jalur Smad2/3 yang menghambat sintesis protein dan meningkatkan degradasi protein otot. Kadar Myostatin diukur secara kuantitatif menggunakan metode Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sesuai protokol kit yang digunakan. Absorbansi dibaca menggunakan

ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm, dan hasil dinyatakan dalam satuan pg/mL berdasarkan kurva standar.

Metode : ELISA

Unit : pg/mL

Skala : Rasio

4.4. Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

1. Kandang hewan percobaan (untuk aklimatisasi dan pemeliharaan)
2. Wadah air minum menci
3. Timbangan hewan
4. Spuit 1 cc
5. Mikropipet dan tip steril
6. Sentrifuge (kecepatan 3000 rpm)
7. Inkubator CO₂
8. ELISA reader
9. *Hypoxic chamber*
10. Peralatan bedah kecil (*dissecting kit*)
11. Laptop dan software statistik
12. Kamera digital untuk dokumentasi
13. *Refrigerator/freezer* untuk penyimpanan exosome dan sampel jaringan
14. Mikrotom.

15. *Cover glass.*

16. *Mounting medium*

4.4.2. Bahan

Bahan atau materi yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

1. Mencit betina galur C57BL/6 usia 8-12 minggu (berat 20–25 g)
2. SH-MSCs dengan dosis 15 μ L, 30 μ L, dan 45 μ L
3. Dexamethasone injeksi (untuk induksi sarcopenia, $\pm 1,5$ mg/kgBB i.p. selama 14 hari)
4. Pakan dan minum standar
5. Larutan NaCl 0,9% (kontrol negatif/injeksi pelarut)
6. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) untuk buffer
7. Ethanol 70% (antisepsis sebelum injeksi)
8. Gas nitrogen sebagai media hipoksia
9. Dexamethasone injeksi
10. Reagen ELISA kit untuk TNF- α
11. Reagen ELISA kit untuk Myostatin
12. Sarung tangan, masker, dan alat pelindung diri lainnya
13. PBS/NaCl 0,9% steril jika diperlukan untuk penyesuaian volume
14. Formalin 10%.
15. Alkohol bertingkat (70%, 95%, hingga 100%).
16. Timbangan presisi.

17. Xylene.

18. Pewarna Hematoksilin-Eosin (HE)

4.5. Cara Penelitian

4.5.1. Perolehan *Ethical Clearance*

Penelitian ini melibatkan penggunaan hewan coba sehingga seluruh prosedur dilaksanakan sesuai standar etika. Sebelum penelitian dimulai, protokol penelitian telah disetujui oleh komite etik hewan. Penanganan mencit dilakukan dengan menjaga hak dan kesejahteraan hewan, serta tindakan analisis jaringan dilakukan setelah prosedur anestesi agar mencit tidak merasakan sakit. Permohonan persetujuan etik untuk penelitian dikeluarkan oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang.

Pengajuan *ethical clearance* mencakup protokol prosedur eksperimental pada mencit betina galur C57BL/6 model sarcopenia yang diinduksi dexamethasone, tata laksana pemberian SH-MSCs secara intraperitoneal dengan variasi dosis, serta mekanisme terminasi dan pengambilan sampel jaringan otot rangka (*gastrocnemius/soleus*) untuk pengukuran kadar TNF- α dan Myostatin. Komite etik akan menilai kepatuhan rancangan terhadap prinsip 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*), termasuk justifikasi penggunaan hewan, perhitungan besar sampel minimal (rumus Federer), penggunaan anestesi/analgesia yang

adekuat, prosedur injeksi yang aseptik, serta pemantauan kesejahteraan hewan (kondisi klinis, berat badan, asupan pakan/minum, dan perilaku) sepanjang aklimatisasi, induksi dexamethasone (± 20 mg/kgBB/hari selama 10 hari), hingga fase terapi SH-MSCs (setiap hari selama 14 hari). Seluruh intervensi dirancang untuk meminimalkan nyeri dan stres, memastikan kandang, pakan, dan lingkungan yang layak, serta dokumentasi lengkap (lembar observasi harian, log pemberian obat/sampel). Persetujuan etik merupakan syarat mutlak sebelum penelitian dilaksanakan di fasilitas laboratorium hewan.

4.5.2. Aklimatisasi

Selama 7 hari sebelum penelitian dimulai mencit menjalani proses aklimatisasi. Mencit ditempatkan di kandang individu dengan pakan dan minum *ad libitum* untuk adaptasi lingkungan.

4.5.3. Induksi dan Validasi Sarcopenia

Pada Hari 1–10, kelompok K2–K4 disuntik dexamethasone intraperitoneal dengan dosis ± 20 mg/kgBB/hari.^{72,73} K1 tidak diberi perlakuan. Validasi induksi Sarcopenia dilakukan pada hari ke-11 dan validasi perlakuan (k3-4) dihari ke -39 melalui pemeriksaan histologi.

Untuk validasi histologi dilakukan dengan pengambilan otot gastrocnemius yang diisolasi dan ditempatkan dalam pre-coolisopentane kemudian disimpan pada -80°C untuk pengolahan lebih lanjut. Otot beku

diembed dalam medium embedding OCT dan diiris dengan ketebalan 10 μm untuk pewarnaan lebih lanjut. Untuk pewarnaan jenis serat otot, sampel difiksasi dalam metanol yang didinginkan terlebih dahulu, diblokir dengan serum kuda 2% selama 1 jam pada suhu ruangan, diikuti dengan inkubasi campuran antibodi primer semalaman pada 4 °C. Antibodi sekunder diinkubasi pada suhu ruangan selama jam. Pewarnaan hematoxylin selama 5-10 menit dan eosin 2-5 menit (H&E) digunakan untuk memperoleh morfologi melintang serat otot.

4.5.4. Prosedur Perlakuan dengan Kondisi Hipoksia

SH-MSCs diproduksi oleh penyedia dengan tahapan ringkas sebagai berikut:

1. Kultur MSC dari tali pusat mencit (*umbilical cord mesenchymal stem cells*) pada medium standar hingga mencapai 80% konfluensi.
2. Prekondisi hipoksia pada kadar $\text{O}_2 \pm 2\%$ selama 24 jam di *hypoxic chamber* terkontrol.
3. Pengumpulan medium terkondisi, diikuti pemurnian *secretome* menggunakan *Tangential Flow Filtration* (TFF) (*cut-off* 10–50 kDa) dan filtrasi steril 0,22 μm .
4. Aliquot, kontrol mutu (sterilitas, endotoksin, protein total, panel sitokin), kemudian penyimpanan $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hingga digunakan.

4.5.6. Persiapan Sediaan SH-MSCs untuk Pemberian

1. Pencairan dilakukan di suhu 4°C/*ice bath*, kemudian dibawa ke suhu

kamar, sediaan tidak boleh dibekukan ulang.

2. Pengenceran (bila diperlukan) menggunakan PBS/NaCl 0,9% steril hingga volume suntik i.v. yang aman (maksimal ~10 mL/kgBB; praktik umum 5–8 mL/kgBB).
3. Semua prosedur dilakukan aseptik (sarung tangan, disinfeksi kulit perut dengan etanol 70%).
4. Setiap kali pemberian, catat berat badan aktual untuk menghitung dosis dan volume.^{73,74}

4.5.7. Pembagian Kelompok

Kelompok perlakuan dibagi menjadi 4 kelompok, dengan masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor mencit betina C57BL/6, sehingga total sampel adalah 30 ekor mencit.

1. K1: Kontrol sehat (tanpa induksi dan tanpa SH-MSCs)
2. K2: Induksi dexamethasone diinduksi dengan Dexamethasone intraperitoneal ± 20 mg/kgBB/hari selama 10 hari (model Sarcopenia)
3. K3: Mencit Model Sarcopenia diinduksi dengan Dexamethasone intraperitoneal ± 20 mg/kgBB/hari selama 10 hari + SH-MSCs dosis rendah (30 μ L) selama 14 hari
4. K4: Mencit Model Sarcopenia diinduksi dengan Dexamethasone intraperitoneal ± 20 mg/kgBB/hari selama 10 hari + SH-MSCs dosis sedang (60 μ L) selama 14 hari

4.5.8. Rute dan Cara Pemberian SH-MSCs

Frekuensi 1 kali/hari pada Hari ke-12 s.d. ke-25 (14 hari terapi), mengikuti fase induksi Sarcopenia dengan dexamethasone intraperitoneal pada Hari 1–10. Diberikan SH-MSCs dengan dosis berbeda (30 μ L dan 60 μ L) melalui injeksi intravena pada ekor mencit, kemudian injeksi perlahan, setiap hari. Pengencer PBS/NaCl 0,9% steril digunakan untuk penyesuaian volume pada kelompok kontrol bila diperlukan.

4.5.9. Terminasi dan Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada Hari ke-39 setelah seluruh rangkaian perlakuan selesai diberikan. Mencit dianestesi terlebih dahulu dan diterminasi sesuai prosedur etik hewan coba. Sampel yang dikoleksi meliputi jaringan otot *gastrocnemius* untuk pemeriksaan kadar TNF- α dan Myostatin. Jaringan otot diambil secara aseptik, dicuci dengan larutan PBS dingin untuk menghilangkan sisa darah, kemudian disimpan pada suhu –80 °C sampai dilakukan proses homogenisasi dan analisis menggunakan kit ELISA sesuai prosedur pabrikan.^{75,76}

4.5.10. Pemeriksaan Biomarker

Analisis Kadar TNF- α dan Myostatin Menggunakan ELISA:

1. Preparasi sampel: Jaringan otot *gastrocnemius* dari mencit betina galur C57BL/6 yang diinduksi dengan dexamethasone untuk memodelkan

sarcopenia dipotong dengan hati-hati dan dibekukan segera menggunakan cairan nitrogen cair untuk mencegah degradasi protein. Sampel jaringan otot kemudian dihancurkan menggunakan homogenizer atau mortar dengan penambahan buffer lisis yang mengandung protease inhibitor untuk melindungi protein dari degradasi. Setelah penghancuran, sampel disentrifugasi pada 4°C dengan kecepatan tinggi (10.000 rpm selama 15 menit) untuk memisahkan fraksi cair dari bagian padat. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk pengukuran kadar TNF- α dan myostatin.

2. Persiapan Reagen dan Standar ELISA: Prosedur ELISA dilakukan menggunakan kit ELISA komersial spesifik untuk pengukuran TNF- α dan myostatin, dengan memastikan kit tersebut memiliki rentang deteksi yang sesuai dengan kadar yang diperkirakan pada sampel. Siapkan standar dengan konsentrasi yang diketahui untuk TNF- α dan myostatin sesuai dengan instruksi kit ELISA, dan pastikan untuk menggunakan kontrol negatif (buffer lisis tanpa sampel) guna memastikan tidak ada kontaminasi dalam proses analisis.

3. Prosedur ELISA

- Pencucian Mikrotiter Plate: Cuci mikrotiter plate dengan buffer PBS yang mengandung 0,05% Tween-20 untuk menghilangkan kontaminasi dan sisa reagen sebelumnya. Cuci plate minimal 3

kali.

- Penambahan Sampel dan Standar: Tambahkan 100 μL supernatan sampel atau standar ke dalam sumur mikrotiter plate sesuai dengan prosedur yang diberikan dalam kit ELISA. Setiap sampel diulang dalam dua atau tiga replikasi untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat.
- Inkubasi: Inkubasi mikrotiter plate pada suhu ruang atau suhu yang disarankan (1–2 jam) agar reaksi antigen-antibodi dapat berlangsung.
- Pencucian: Setelah inkubasi, cuci plate 3–5 kali dengan buffer PBS-Tween untuk menghilangkan reagen yang tidak terikat.
- Penambahan Enzim Konjugat: Tambahkan 100 μL larutan enzim konjugat (berupa antibodi yang terkonjugasi dengan enzim seperti HRP atau AP) ke dalam setiap sumur. Inkubasi lagi selama 1 jam pada suhu ruang.
- Pencucian: Cuci kembali dengan buffer PBS-Tween setelah inkubasi enzim konjugat.
- Penambahan Substrat: Tambahkan 100 μL substrat TMB untuk enzim konjugat dan inkubasi selama 10–15 menit hingga warna terbentuk.
- Penghentian Reaksi: Tambahkan 50 μL larutan penghenti (asam

sulfat atau asam fosfat) untuk menghentikan reaksi.

- Pembacaan Absorbansi: membaca absorbansi sumur pada panjang gelombang yang sesuai (450 nm) menggunakan alat pembaca mikropate.

4. Pengukuran dilakukan pada supernatan hasil ekstraksi atau homogenisasi jaringan otot yang dianalisis menggunakan teknik ELISA. Konsentrasi biomarker TNF- α dan myostatin dinyatakan dalam ng/L untuk TNF- α dan ng/mL untuk myostatin, yang dihitung berdasarkan kurva standar yang diperoleh dari kit ELISA.

4.6. Langkah Penelitian

1. Persiapan hewan coba: 36 ekor mencit betina galur C57BL/6 (usia 8–12 minggu; berat 30–35 g) diperoleh dari *Animal Research Center, Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Indonesia. Semua mencit menjalani aklimatisasi selama 7 hari dengan pakan dan minum *ad libitum*.
2. Induksi Sarcopenia: Kelompok K2–K4 disuntik dexamethasone intraperitoneal dosis ± 20 mg/kgBB/hari selama 10 hari (Hari 1–10). K1 tidak diberi induksi. Validasi Sarcopenia dilakukan melalui Histologi HE.
3. Dari 36 ekor mencit C57BL/6 diambil 10 ekor mencit yang tanpa induksi. 2 ekor mencit untuk validasi dan 8 ekor lainnya untuk kelompok kontrol sehat (K1). Selanjutnya 26 ekor sisanya dilakukan induksi dengan

dexamethasone 20mg/KgBB i.p selama 10 hari kemudian 2 ekor mencit yang sudah di induksi diambil untuk validasi dan 24 ekor sisanya dibagi secara acak menjadi 3 kelompok (masing-masing 8 ekor) :

→ K2: Induksi dexamethasone saja (model Sarcopenia)

→ K3: Induksi dexamethasone + SH-MSCs dosis rendah (30 μ L)

→ K4: Induksi dexamethasone + SH-MSCs dosis sedang (60 μ L)

4. Validasi Sarcopenia terhadap mencit yang sudah di induksi dexamethasone 20mg/KgBB i.p selama 10 hari dengan pemeriksaan Histologi HE di lakukan pada hari ke-11 atau satu hari setelah induksi dexamethasone selesai.
5. Pemberian SH-MSCs: Kelompok K3–K4 mendapat terapi SH-MSCs melalui injeksi intravena pada ekor mencit sesuai dosis masing-masing 1 kali/hari selama 14 hari (Hari 12–25). K1 dan K2 tidak menerima SH-MSCs.
6. Terminasi dan pengambilan sampel: Pada Hari 39 atau 7 hari setelah pemberian SH-MSCs untuk mendapat efek maksimal dari pemberian SH-MSCs. Mencit dianestesi dan diterminasi sesuai prosedur etik. Sampel yang diambil adalah jaringan otot gastrocnemius: untuk analisis kadar TNF-a dan Myostatin serta Analisa histologi.
7. Pemeriksaan biomarker dengan ELISA:
 - Homogenat jaringan otot diperiksa menggunakan ELISA Kit
 - Pembacaan dilakukan dengan ELISA reader pada 450 nm

→ Konsentrasi biomarker TNF- α dan myostatin dinyatakan dalam pg/mL untuk TNF- α dan ng/mL untuk myostatin, dihitung dari kurva standar.

8. Analisis data menggunakan uji statistik untuk membandingkan kadar antar kelompok.

4.7. Tempat dan Waktu Penelitian

4.7.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di *Animal Research Center, Stem Cell and Cancer Research (SCCR)* Indonesia dan laboratorium *CITO*.

4.7.2. Waktu Penelitian

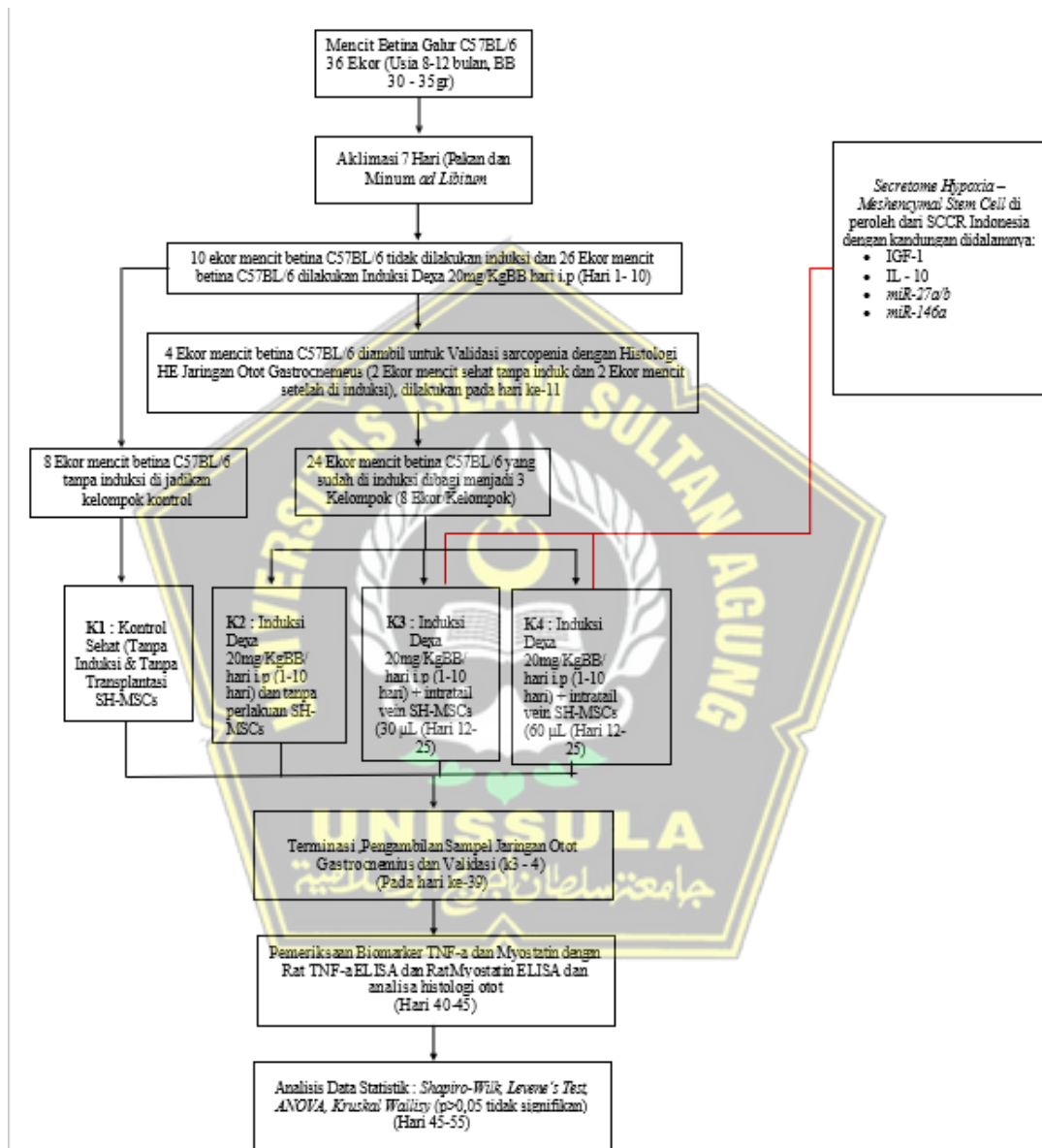
Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2025. Penelitian diawali dengan aklimatisasi mencit selama 7 hari, dilanjutkan induksi Sarcopenia dengan dexamethasone selama 10 hari, dilanjutkan validasi Sarcopenia pada hari ke-11. Selanjutnya, kelompok perlakuan menerima terapi SH-MSCs selama 14 hari. Pada hari ke-39 atau 7 hari setelah perlakuan, mencit diterminasi untuk pengambilan sampel jaringan otot, kemudian dilakukan pemeriksaan histologi (k3-4) di *SCCR* dan dilakukan pemeriksaan ELISA di *CITO* selama 3–5 hari. Tahap akhir adalah analisis data dan penyusunan laporan yang berlangsung sekitar 7–10 hari.

4.8. Metoda Analisis Data

Data hasil pemeriksaan kadar TNF- α dan Myostatin (jaringan otot) terlebih

dahulu diuji normalitas menggunakan uji *Shapiro–Wilk* dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$. Data myostatin memiliki nilai $p > 0,05$ sehingga data dianggap berdistribusi normal, sedangkan data TNF- α tidak berdistribusi normal $p < 0,05$. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas varians menggunakan *Levene's Test*. Data myostatin bersifat normal dan homogen, sehingga analisis dilanjutkan dengan uji *One-Way ANOVA* untuk membandingkan rata-rata antar lima kelompok perlakuan. Sebaliknya, data TNF- α dengan distribusi tidak normal ($p < 0,05$ pada *Shapiro–Wilk*) dilakukan analisis dengan uji non-parametrik *Kruskal–Wallis*. Hasil uji *One-Way ANOVA* maupun *Kruskal–Wallis* tidak menunjukkan perbedaan ($p > 0,05$) sehingga analisis tidak dilanjutkan uji *post hoc*. Seluruh hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel distribusi nilai rata-rata $\pm$ standar deviasi, grafik perbandingan antar kelompok, serta narasi ilmiah untuk menjelaskan makna biologis perbedaan kadar TNF- α dan Myostatin pada masing-masing kelompok perlakuan.

4.9. Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi pengaruh *Secretome Hypoxia – Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) terhadap kadar TNF- α dan Myostatin pada mencit betina galur C57BL/6 model sarcopenia melalui induksi dexamethasone. Penelitian berlangsung pada bulan Oktober 2025 hingga Januari 2026 di *Stemcell and Cancer Center Research* Indonesia dan laboratorium *CITO*, Semarang.

Desain penelitian ini bersifat eksperimental *in vivo* dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design*, menggunakan model hewan yang merepresentasikan penurunan massa dan fungsi otot (sarcopenia). Hewan percobaan dibagi secara acak menurut Rancangan Acak Lengkap (RAL) menjadi dua kelompok, yakni kelompok perlakuan yang menerima SH-MSCs dan kelompok kontrol.

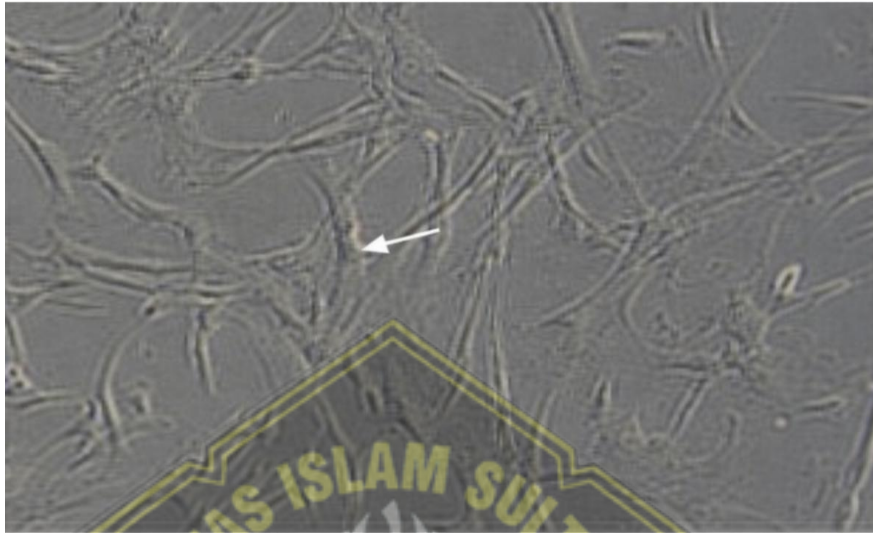
Setelah intervensi, dilakukan pengukuran kadar TNF- α sebagai indikator tingkat inflamasi, serta Myostatin sebagai penanda proses degradasi dan regulasi pertumbuhan otot. Analisis ini bertujuan untuk menilai kemampuan SH-MSCs dalam mengurangi inflamasi dan menekan ekspresi Myostatin, sehingga berpotensi melindungi jaringan otot dari degenerasi akibat sarcopenia.

5.1.1 Hasil Validasi SH-MSCs

Sumber sel berupa *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) diperoleh oleh Laboratorium SCCR Indonesia, Semarang, yang diisolasi dari jaringan tali pusat mencit pada usia kehamilan 15 hari. Pasca-isolasi, sel-sel tersebut dikultivasi dalam wadah kultur (flask) menggunakan medium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) dengan menerapkan protokol standar laboratorium.

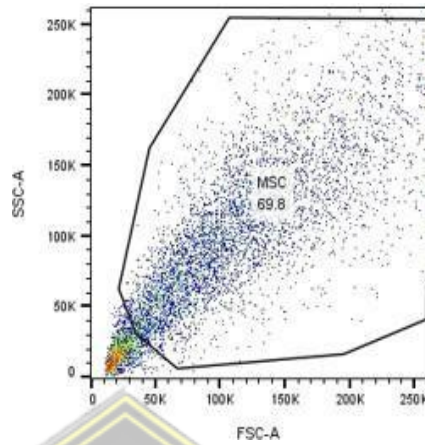
Evaluasi terhadap aspek morfologi sel dilaksanakan pada fase *passage* kelima melalui pengamatan mikroskop cahaya inversi. Hasil dokumentasi visual menunjukkan bahwa populasi sel menampilkan karakteristik fisik berupa bentuk memanjang (*spindle-shaped* atau fusiform) yang menjadi ciri khas identitas MSC, disertai kemampuan melekat yang kuat pada permukaan flask. Konsistensi dalam dimensi, arah pertumbuhan, serta pola sebaran sel yang homogen menunjukkan adanya stabilitas fenotipik dan tingkat kelangsungan hidup sel yang optimal selama proses inkubasi *in vitro* (Gambar 5.1).



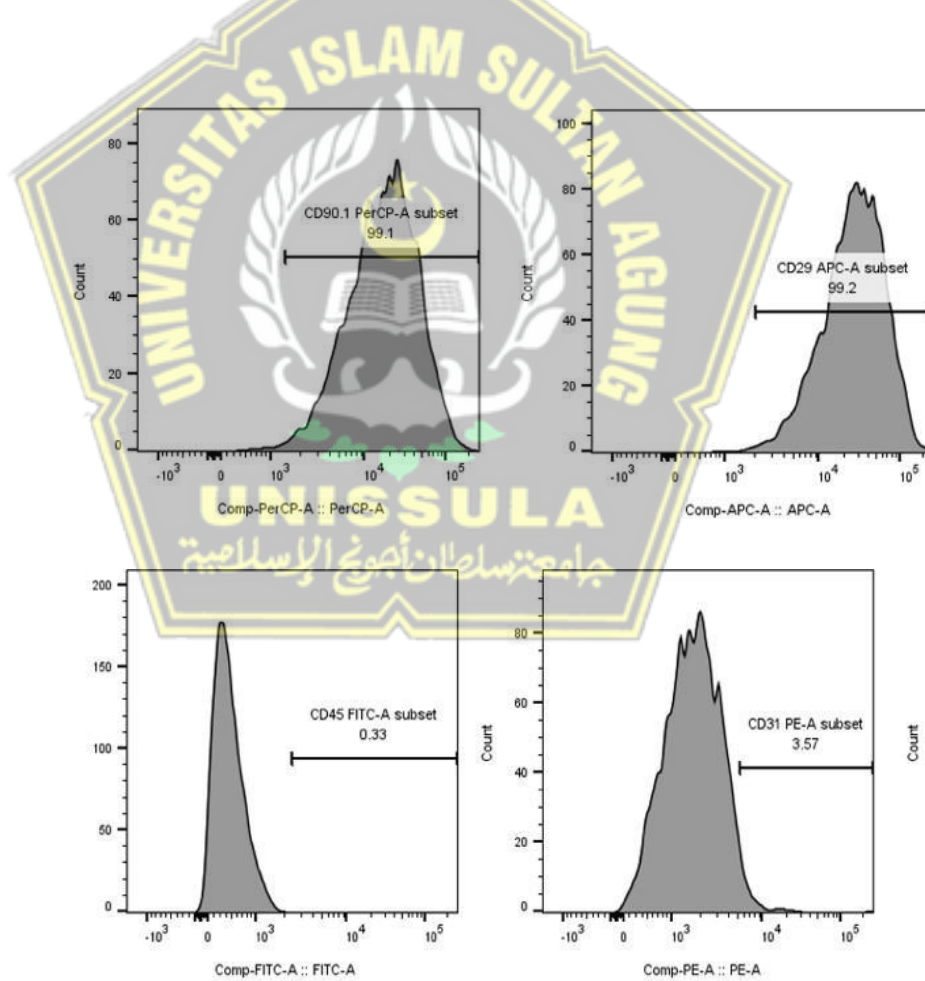


Gambar 5.1 Morfologi Khas MSC. Morfologi berbentuk fibroblast-like pada pembesaran 100x

Karakterisasi sel punca divalidasi menggunakan teknik *flow cytometry* untuk memverifikasi identitas sel berdasarkan profil protein permukaannya. Prosedur ini krusial untuk memetakan marka spesifik yang menjadi standar baku identifikasi MSCs, dengan fokus utama pada deteksi antigen positif seperti CD90 dan CD29, serta pengecekan terhadap antigen negatif yakni CD45 dan CD31.



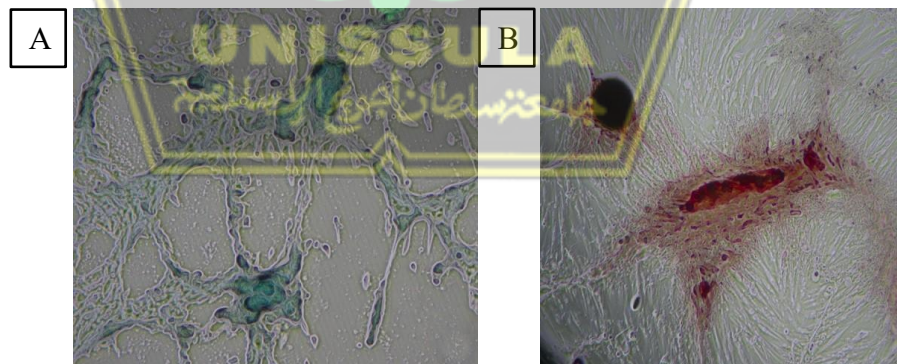
Gambar 5.2 Gating populasi sel MSC yang *viable*



Gambar 5.3 Analisis *flow cytometry* terhadap ekspresi CD45, CD31, CD90 dan CD29

Hasil pemeriksaan kuantitatif (Gambar 5.2 dan 5.3) memperlihatkan bahwa populasi sel dalam kultur menunjukkan dominasi ekspresi CD90 (99,98%) dan CD29 (99,25%), yang memvalidasi identitasnya sebagai MSCs. Sebaliknya, keberadaan penanda negatif CD45 (0,14%) serta CD31 (0,05%) ditemukan pada level yang sangat minimal. Hasil tersebut membuktikan bahwa isolasi dan kultivasi sel telah berhasil menghasilkan populasi yang sesuai dengan standar fenotipik MSCs berdasarkan karakteristik ekspresi permukaan seluler.

Setelah identitas MSCs dikonfirmasi melalui analisis *flow cytometry* berdasarkan kriteria standar ISCT, kapasitas diferensiasi MSC diuji secara fungsional menggunakan medium induksi osteogenik dan adipogenik. Hasil observasi ditampilkan pada Gambar 5.4A dan B.



Gambar 5.4 Kemampuan MSCs berdiferensiasi. (A) Berdeferensiasi menjadi *Chondrocyte Alician Blue Staining* perbesaran 100x.(B) Berdeferensiasi menjadi *Osteogenic Alizarin-red staining* perbesaran 200x

Hasil observasi mikroskopis membuktikan bahwa populasi sel tersebut memiliki kemampuan bertransformasi menjadi osteosit, yang terkonfirmasi melalui deposit matriks kalsium yang terwarnai positif oleh *Alizarin Red*. Selain itu, sel juga berhasil berkembang menjadi adiposit, sebagaimana dibuktikan oleh keberadaan vakuola lipid intraseluler yang bereaksi positif terhadap pewarnaan *Oil Red O*. Data ini memberikan bukti kuat bahwa sel yang diisolasi bersifat multipoten, memenuhi persyaratan fundamental sel punca mesenkim yang sanggup berdiferensiasi menjadi garis keturunan sel spesifik di bawah pengaruh stimulasi lingkungan yang tepat.

Tahapan berikutnya adalah melakukan inkubasi MSCs dalam *hypoxic chamber* dengan konsentrasi oksigen sebesar 5% selama 24 jam. Pasca-inkubasi, medium kultur yang telah diperkaya dengan sekretom sel dikoleksi untuk kemudian dimurnikan menggunakan teknik *Tangential Flow Filtration* (TFF). Dalam prosedur filtrasi ini, digunakan membran khusus dengan ambang batas 10–100 kDa untuk memisahkan komponen *secretome* berdasarkan berat molekulernya. Isolat yang dihasilkan, yang mencakup berbagai protein serta agen bioaktif dalam rentang 10–100 kDa, selanjutnya dikonsentrasikan hingga membentuk *Secretome Hypoxia – Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs). Karakteristik serta profil protein dari SH-MSCs yang telah dimurnikan ditampilkan pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Profil Komponen SH-MSCs

Parameter	Hasil	Standar	Metode Analisis
VEGF	1981 pg/mL	>100 pg/mL	ELISA
INF- γ	41,54 pg/mL	$\leq$ 50 pg/mL	ELISA
TNF- α	<i>Undetected</i>	< 100 pg/mL	ELISA
IGF	6292 pg/mL	> 100 pg/mL	ELISA
IL-10	157 pg/mL	> 100 pg/mL	ELISA
miRNA 132-3p	Positive (3.35)		qPCR

5.1.2 Hasil Validasi Sarcopenia

Validasi model sarcopenia pada mencit betina galur C57BL/6 dilaksanakan melalui pemantauan berat badan serta pemeriksaan histopatologis pada otot gastrocnemius. Evaluasi struktur jaringan dilakukan menggunakan teknik pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) dengan observasi mikroskopis pada perbesaran 100 $\times$ dan 400 $\times$ yang dilakukan pada hari ke-11, yaitu 1 hari setelah induksi dexamethasone dosis 20 mg/kgBB selesai dilakukan selama sepuluh hari. Parameter berat badan digunakan sebagai indikator makroskopis untuk melihat status fisiologis subjek secara menyeluruh selama periode perlakuan. Rincian mengenai perubahan berat badan mencit selama penelitian ditampilkan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Hasil Pengukuran Berat Badan Mencit Betina C57BL/6

Kelompok	n	BB Awal (g) Mean $\pm$ SD	BB Akhir (g) Mean $\pm$ SD	Δ BB (g) Mean $\pm$ SD	Interpretasi
K1 (mencit sehat)	8	30,00 $\pm$ 0,76	31,50 $\pm$ 1,07	+1,50 $\pm$ 1,41	Berat badan meningkat (normal)
K2 (kontrol negatif)	8	36,50 $\pm$ 1,60	28,63 $\pm$ 2,00	- 7,88 $\pm$ 3,18	Penurunan berat badan signifikan akibat induksi dexamethasone
K3 (SH- MSC 30 μ L)	8	36,38 $\pm$ 0,92	28,00 $\pm$ 3,25	- 8,38 $\pm$ 3,58	SH-MSC tidak mencegah penurunan BB
K4 (SH- MSC 60 μ L)	8	35,88 $\pm$ 1,25	30,75 $\pm$ 4,74	- 5,13 $\pm$ 5,00	Penurunan BB lebih ringan dibandingkan kelompok SH-MSC 30 μ L

Data pada Tabel 5.2 mengindikasikan bahwa rerata berat badan awal di seluruh kelompok cenderung homogen, meskipun subjek pada kelompok kontrol sehat secara fisiologis memiliki berat badan awal yang sedikit lebih ringan. Pasca-perlakuan, seluruh kelompok yang terpapar dexamethasone memperlihatkan reduksi berat badan, yang berbanding terbalik dengan kelompok sehat tanpa induksi yang justru mengalami peningkatan berat badan.

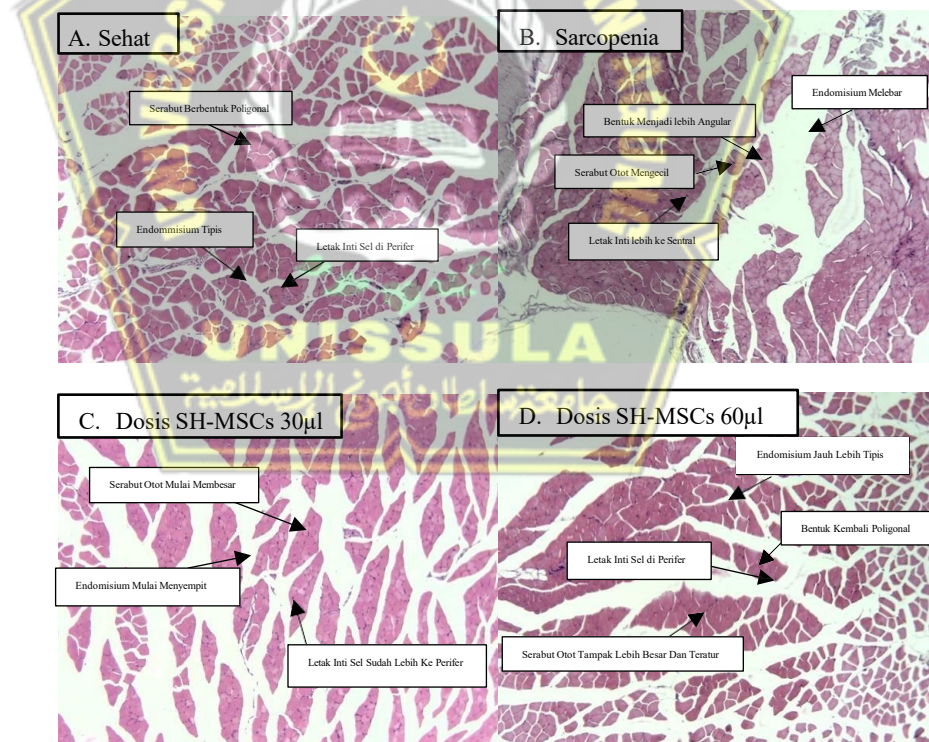
Melalui uji statistik, pemberian dexamethasone dikonfirmasi secara signifikan memicu penurunan berat badan (Δ BB) pada subjek penelitian ($F = 13,223$; $p < 0,001$) dengan kekuatan efek yang besar ($\eta^2 = 0,586$).

Kelompok K2 ($-7,88 \pm 3,18$ g) serta K3 ($-8,38 \pm 3,58$ g) menunjukkan derajat penurunan berat badan yang hampir sama, yang merepresentasikan bahwa intervensi SH-MSCs dosis 30 μ L belum cukup kuat untuk mengompensasi dampak katabolik dari dexamethasone. Akan tetapi, pada kelompok K4, penurunan berat badan tampak lebih rendah ($-5,13 \pm 5,00$ g), yang menunjukkan adanya perlindungan parsial dari pemberian SH-MSCs dosis tinggi 60 μ L. Sebaliknya, kelompok kontrol sehat (K1) menunjukkan tren kenaikan berat ($+1,50 \pm 1,41$ g), yang menegaskan adanya perbedaan nyata antara status fisiologis normal dengan kondisi mencit yang mengalami sarcopenia ($p < 0,05$). Temuan ini memvalidasi bahwa dexamethasone menyebabkan penurunan massa tubuh, sedangkan pemberian SH-MSCs dosis tinggi menghambat laju penurunan berat badan, meski belum sepenuhnya memulihkan ke kondisi normal.

Ditinjau dari aspek histopatologi, otot gastrocnemius pada model sarcopenia memperlihatkan karakteristik atrofi yang nyata, ditandai dengan reduksi diameter serat otot, kemunculan serat *piceau*, serta ekspansi endomisium akibat deposit jaringan fibrotik. Meskipun nukleus masih berlokasi di area perifer, keterbatasan jumlah inti sentral mengisyaratkan bahwa mekanisme regenerasi jaringan tidak berlangsung secara adekuat. Fenomena struktural ini sangat kontras dengan kelompok sehat yang memiliki serabut otot berbentuk poligonal dengan densitas

tinggi, susunan yang kohesif, serta profil morfologi otot rangka dewasa yang normal tanpa indikasi degradasi jaringan.

Berdasarkan pengamatan mikroskopis, jaringan otot dengan kondisi sarkopenia menampilkan morfologi serabut yang tidak seragam, di mana dominasi serat-serat berukuran kecil dengan bentuk ireguler tampak nyata disertai dengan meluasnya jaringan ikat endomisium. Selain itu, pergeseran posisi nukleus menuju area sentral serabut menjadi penanda patognomonik bagi terjadinya degenerasi struktural serta proses atrofi pada otot tersebut (Gambar 5.5).



Gambar 5.5 Gambaran Histologi Otot Gastrocnemeus Mencit Betina C57BL/6. A. Histologi Otot Gastrocnemeus Mencit Betina C57BL/6 tanpa induksi dan perlakuan. B. Histologi Otot Gastrocnemeus Mencit Betina C57BL/6 dengan induksi sarcopenia.

C. Histologi Otot Gastrocnemeus Mencit Betina C57BL/6 dengan induksi sarcopenia dan perlakuan SH-MSCs 30 μ L. D. Histologi Otot Gastrocnemeus Mencit Betina C57BL/6 dengan induksi sarcopenia dan perlakuan SH-MSCs 60 μ L

Intervensi menggunakan SH-MSCs pada dosis 30 μ L mulai memperlihatkan efek perbaikan, yang teramati dari peningkatan dimensi serabut otot serta transisi bentuk sel yang kembali menyerupai struktur poligonal. Meskipun sebagian besar inti sel telah menempati posisi normal di area perifer, masih adanya inti yang berada di tengah menunjukkan bahwa otot sedang dalam masa penyembuhan dan belum pulih sepenuhnya. Hasil yang lebih baik diperoleh melalui pemberian SH-MSCs dosis 60 μ L, di mana jaringan otot menampilkan densitas yang lebih tinggi, ukuran serabut yang lebih masif dan homogen, serta mayoritas inti sel yang telah menetap di tepi sarkolema, mencerminkan fase regenerasi yang hampir sempurna.

Setelah validasi model sarcopenia berhasil dilakukan, hewan coba dibagi ke dalam empat kelompok, dengan masing-masing kelompok berjumlah 6 ekor mencit betina galur C57BL/6. Mencit sehat yang tidak diinduksi dexamethasone ditetapkan sebagai kontrol sehat (K1), sementara mencit dengan kondisi sarcopenia dibagi secara acak ke dalam tiga kelompok. Kelompok K2 berfungsi sebagai kontrol negatif tanpa pemberian terapi, sedangkan kelompok K3 menerima injeksi SH-MSCs

dosis 30 μ l, sedangkan K4 menerima injeksi SH-MSCs dosis 60 μ l. Pemberian SH-MSCs dilakukan melalui intratail vein selama 14 hari.

Pada hari ke-39 dilakukan pengumpulan sampel jaringan otot, bertepatan dengan satu minggu setelah pemberian terapi SH-MSCs, untuk memastikan akurasi dalam mendeteksi perubahan kadar TNF- α dan myostatin. Jaringan otot yang telah diisolasi segera diproses untuk mencegah terjadinya kerusakan pada komponen di dalam sel. Prosedur homogenisasi jaringan memanfaatkan larutan *buffer* lisis yang ditambahkan inhibitor protease dilakukan untuk menghambat aktivitas enzim proteolitik yang dapat mendegradasi protein. Setelah proses homogenisasi selesai, dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan supernatan agar memperoleh isolat protein, yang selanjutnya dianalisis kadar konsentrasi totalnya serta divalidasi kualitasnya.

Isolat protein tersebut kemudian digunakan sebagai sampel dalam pengujian ELISA untuk pengukuran kadar biomarker. Fokus utama penelitian ini adalah pengukuran konsentrasi TNF- α dan Myostatin, yang menjadi parameter dalam mengkaji mekanisme patofisiologi atrofi otot akibat ketidakseimbangan antara mediator pro-inflamasi serta faktor penghambat pertumbuhan otot. Melalui metode ELISA, diperoleh data kuantitatif mengenai level kedua biomarker tersebut secara akurat, yang hasilnya kemudian dikorelasikan dengan efektivitas intervensi SH-MSCs dalam mendukung proses restorasi jaringan otot.

5.1.3 Hasil Pemeriksaan Kadar TNF- α pada Jaringan Otot

Kadar TNF- α pada jaringan otot mencit yang diukur pada hari ke-39 pasca-intervensi dianalisis untuk menilai derajat respons peradangan akibat induksi dexamethasone, sekaligus mengevaluasi efikasi terapi secretome SH-MSCs dalam meregulasi sitokin pro-inflamasi. Hasil pengukuran kadar TNF- α pada jaringan otot mencit ditampilkan pada Tabel 5.3.

Kelompok	Mencit Sehat (K1)	Kontrol Negatif (K2)	SH-MSCs 30 μ L (K3)	SH-MSCs 60 μ L (K4)	<i>P value</i>
Kadar TNF-α (ng/L) (n=6)					
<i>Mean</i>	211,92	246,00	190,37	186,87	
<i>SD</i>	60,06	33,62	50,79	35,98	
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,022	0,971	0,105	0,753	
<i>Levene Test</i>					0,532
<i>Kruskal-Wallis</i>					0,097

Tabel 5.3 Deskriptif Rata-rata Kadar TNF- α dan Uji *Kruskal-Wallis*

Keterangan:

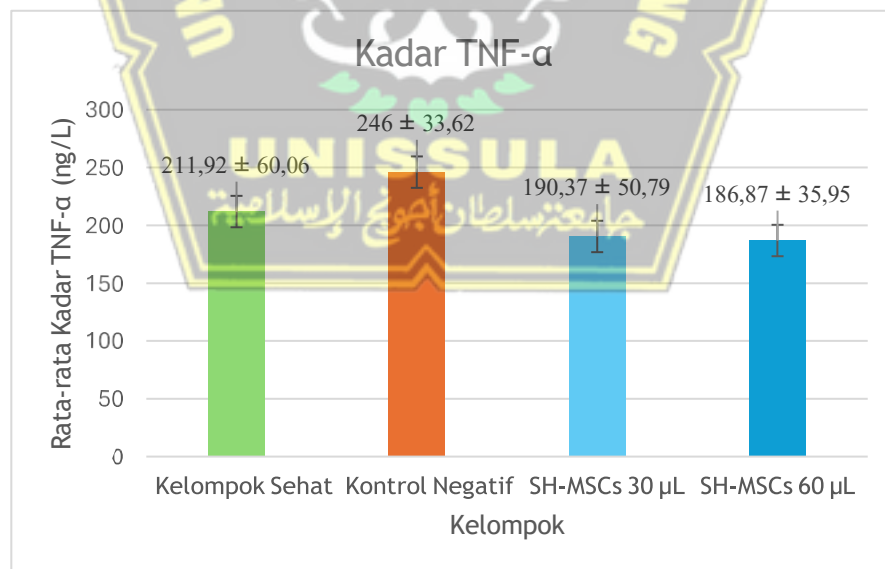
Shapiro-Wilk = Distribusi tidak normal ($p < 0,05$)

Levene Test = Data homogen ($p > 0,05$)

Kruskal-Wallis = Tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok ($p < 0,05$)

Berdasarkan hasil analisis kadar TNF- α pada jaringan otot mencit (n=6 per kelompok), rerata kadar TNF- α tertinggi ditemukan pada kelompok kontrol negatif (K2) sebesar 246,00 ng/L dengan standar deviasi 33,62, diikuti kelompok mencit sehat (K1) sebesar 211,92 $\pm$ 60,06 ng/L. Kelompok perlakuan SH-MSCs menunjukkan rerata yang lebih rendah dibandingkan kontrol negatif, yaitu 190,37 $\pm$ 50,79 ng/L pada dosis 30 μ L (K3) dan 186,87 $\pm$ 35,98 ng/L pada dosis 60 μ L (K4).

Uji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa data pada kelompok K1 tidak terdistribusi normal ($p=0,022$), sedangkan kelompok K2 ($p=0,971$), K3 ($p=0,105$), dan K4 ($p=0,753$) terdistribusi normal. Uji homogenitas varians menggunakan Levene Test menunjukkan nilai $p=0,532$ ($p>0,05$), yang berarti varians antar kelompok homogen. Karena salah satu kelompok tidak memenuhi asumsi normalitas, maka analisis perbedaan antar kelompok dilakukan menggunakan uji non-parametrik Kruskal–Wallis. Hasil uji Kruskal–Wallis menunjukkan nilai $p=0,097$ ($p>0,05$), yang berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik kadar TNF- α antar keempat kelompok. Namun secara deskriptif, pemberian SH-MSCs dosis 30 μ L dan 60 μ L menunjukkan kecenderungan penurunan kadar TNF- α dibandingkan kelompok kontrol negatif.



Gambar 5.6 Perbandingan Kadar TNF- α antar Kelompok Perlakuan

5.1.4 Hasil Pemeriksaan Kadar Myostatin pada Jaringan Otot

Pengukuran kadar Myostatin pada jaringan otot mencit dilakukan pada hari ke-39 bertujuan untuk mengevaluasi derajat inhibisi pertumbuhan otot serta efektivitas pemberian terapi *secretome* SH-MSCs dalam meregulasi faktor penghambat miogenesis tersebut. Data hasil pengukuran kadar Myostatin pada jaringan otot ditampilkan pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4 Deskriptif Rata-rata Kadar Myostatin dan Uji *One Way-ANOVA*

Kelompok	Mencit Sehat (K1)	Kontrol Negatif (K2)	SH-MSCs 30 μ L (K3)	SH-MSCs 60 μ L (K4)	<i>P value</i>
Kadar Myostatin (pg/mL) (n=6)					
<i>Mean</i>	3,31	3,69	3,69	3,59	
<i>SD</i>	0,41	0,18	0,15	0,39	
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,253	0,232	0,289	0,327	
<i>Levene Test</i>					0,203
<i>One Way-ANOVA</i>					0,133

Keterangan:

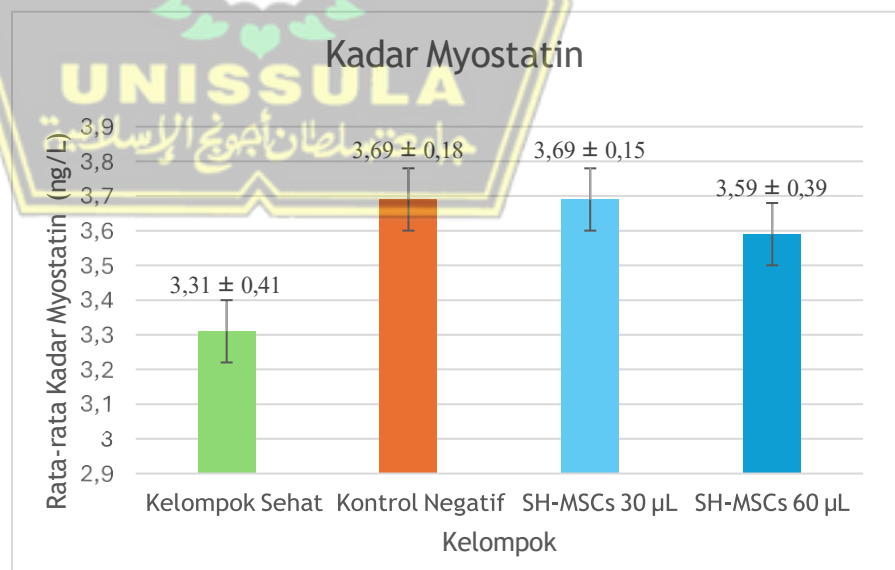
Shapiro-Wilk = Distribusi normal ($p > 0,05$)

Levene Test = Data homogen ($p > 0,05$)

One Way-ANOVA = Tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok ($p > 0,05$)

Berdasarkan Tabel 5.4, Rerata kadar Myostatin tertinggi ditemukan pada kelompok kontrol negatif ($3,69 \pm 0,18$ pg/mL) dan kelompok SH-MSCs 30 μ L ($3,69 \pm 0,15$ pg/mL), sedangkan kelompok SH-MSCs 60 μ L menunjukkan rerata yang sedikit lebih rendah ($3,59 \pm 0,39$ pg/mL). Kelompok mencit sehat memiliki rerata kadar Myostatin terendah ($3,31 \pm 0,41$ pg/mL).

Uji normalitas Shapiro–Wilk menunjukkan seluruh kelompok terdistribusi normal ($p>0,05$), dan uji homogenitas varians menggunakan Levene Test menunjukkan varians yang homogen ($p=0,203$). Oleh karena itu, analisis perbedaan antar kelompok dilakukan menggunakan uji One-Way ANOVA. Hasil uji ANOVA menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik antar kelompok ($p=0,133$). Meskipun tidak signifikan secara statistik, secara deskriptif terlihat bahwa kelompok SH-MSCs 60 μL menunjukkan kecenderungan penurunan kadar Myostatin dibandingkan kontrol negatif. Temuan ini mengindikasikan potensi efek modulasi SH-MSCs terhadap ekspresi Myostatin pada model sarcopenia yang diinduksi dexamethasone, yang selanjutnya perlu dianalisis dalam konteks mekanisme molekuler dan respons dosis pada pembahasan.



Gambar 5.7 Perbandingan Kadar Myostatin antar Kelompok Perlakuan

Secara keseluruhan, hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif yang diinduksi dexamethasone memiliki kecenderungan peningkatan kadar TNF- α dan Myostatin dibandingkan kelompok sehat, yang mengindikasikan aktivasi jalur inflamasi dan katabolik pada model sarcopenia. Pemberian SH-MSCs dosis 30 μ L dan 60 μ L menunjukkan kecenderungan penurunan kadar TNF- α , serta penurunan deskriptif kadar Myostatin terutama pada dosis 60 μ L. Meskipun uji statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p>0,05$), pola perubahan kedua biomarker tersebut memperlihatkan respons biologis terhadap intervensi SH-MSCs. Temuan ini menunjukkan bahwa SH-MSCs berpotensi memodulasi mediator inflamasi dan regulator negatif pertumbuhan otot pada model sarcopenia yang diinduksi dexamethasone, yang selanjutnya akan dianalisis lebih lanjut dalam pembahasan terkait mekanisme molekuler dan implikasi terapeutiknya.

5.2 Pembahasan

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efek *Secretome Hypoxia–Mesenchymal Stem Cells* (SH-MSCs) terhadap modulasi peradangan dan regulasi faktor katabolik pada jaringan otot mencit yang mengalami degenerasi. Parameter yang digunakan meliputi kadar TNF- α sebagai sitokin pro-inflamasi utama dan kadar Myostatin sebagai penghambat pertumbuhan otot. Induksi sarkopenia dinyatakan berhasil berdasarkan validasi klinis dan struktural, ditandai oleh penurunan bobot tubuh yang signifikan serta perubahan histopatologis, seperti atrofi serat otot dan penebalan endomisium. Peningkatan ekspresi molekuler yang terkait dengan degradasi protein menegaskan terjadinya patofisiologi otot yang sesuai dengan profil sarkopenia akibat paparan glukokortikoid.

Hasil karakterisasi SH-MSCs menunjukkan bahwa sel punca tersebut memiliki fenotipe dan fungsi yang sesuai standar, terbukti dengan tingginya ekspresi penanda positif CD90 (99,98%) dan CD29 (99,25%) serta rendahnya penanda negatif CD45 (0,14%) dan CD31 (0,05%). Melalui induksi hipoksia (5% O₂), secretome yang dihasilkan kaya faktor bioaktif, yang secara biologis berpotensi menekan jalur peradangan dan menurunkan ekspresi faktor katabolik, sehingga berperan dalam menurunkan kadar TNF- α dan Myostatin pada jaringan otot.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok mencit sehat (K1) menunjukkan kadar TNF- α sebesar $211,92 \pm 60,06$ ng/L, yang relatif tinggi dibandingkan kelompok SH-MSCs, meskipun masih lebih rendah dibandingkan

K2. Kadar TNF- α pada kelompok sehat ini mungkin mencerminkan variabilitas biologis individu, karena meskipun tidak diberi perlakuan induksi sarcopenia, beberapa stres fisiologis minor atau adaptasi metabolik bisa menyebabkan peningkatan ringan TNF- α . Hal ini sejalan dengan teori bahwa TNF- α berperan sebagai mediator basal homeostasis otot dan dapat meningkat sementara sebagai respons terhadap rangsangan minor, tanpa menimbulkan degenerasi otot yang nyata.⁷⁷

Kelompok kontrol negatif (K2), yang hanya mengalami induksi sarcopenia melalui dexamethasone tanpa perlakuan SH-MSCs, memiliki kadar TNF- α tertinggi dengan rata-rata $246,00 \pm 33,62$ ng/L, meskipun tidak berbeda secara statistik. Kadar TNF- α yang meningkat pada kelompok ini konsisten dengan mekanisme inflamasi yang terjadi akibat penurunan massa otot. Dexamethasone dapat memicu stres oksidatif dan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α melalui aktivasi jalur NF- κ B, sehingga otot mengalami kerusakan dan inflamasi yang lebih intens. Kondisi ini menunjukkan bahwa model sarcopenia yang digunakan berhasil menimbulkan respons inflamasi sistemik, yang tercermin dari tingginya kadar TNF- α pada kelompok kontrol negatif.⁷⁸

Kelompok yang menerima perlakuan SH-MSCs 30 μ L (K3) menunjukkan penurunan kadar TNF- α menjadi $190,37 \pm 50,79$ ng/L. Penurunan ini mengindikasikan bahwa SH-MSCs mulai memberikan efek modulasi inflamasi. Secara mekanistik, secretome dari SH-MSCs mengandung faktor antiinflamasi, seperti IL-10 dan TGF- β , yang mampu menghambat aktivasi jalur NF- κ B serta

menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α dalam berbagai model inflamasi.¹⁰ Hasil ini menunjukkan adanya efek protektif awal terhadap otot yang mengalami degenerasi, meskipun dosis 30 μ L masih memberikan pengaruh yang terbatas, sehingga kadar TNF- α tidak jauh berbeda dengan kelompok kontrol negatif.

Kelompok SH-MSCs 60 μ L (K4) menunjukkan kadar TNF- α terendah, yaitu $186,87 \pm 35,98$ ng/L, menandakan bahwa dosis yang lebih tinggi memiliki kemampuan lebih efektif dalam menekan respons inflamasi. Mekanisme ini kemungkinan terkait dengan peningkatan jumlah molekul antiinflamasi dalam secretome yang mampu menghambat produksi TNF- α oleh sel otot dan sel imun yang teraktivasi akibat sarcopenia. Penurunan TNF- α pada kelompok ini sejalan dengan teori bahwa MSCs dapat memodulasi mikroenvironment jaringan melalui sekresi faktor parakrin, menekan sitokin proinflamasi, dan meningkatkan regenerasi otot dengan cara menurunkan apoptosis serta stres oksidatif.⁷⁹ Dalam model inflamasi lain, pemberian secretome MSC terbukti mengurangi ekspresi TNF- α dan mediator pro-inflamasi lainnya, memperlihatkan kemampuan secretome dalam meredam respons inflamasi dan mendukung proses perbaikan jaringan.⁸⁰

Secara keseluruhan, meskipun analisis *Kruskal–Wallis* menunjukkan bahwa perbedaan antar kelompok tidak signifikan secara statistik ($p=0,097$), pola deskriptif yang muncul konsisten dengan mekanisme biologis yang telah dilaporkan dalam literatur. TNF- α cenderung meningkat pada kondisi sarcopenia

tanpa perlakuan, sedikit tinggi pada individu sehat karena variabilitas biologis, dan menunjukkan penurunan progresif pada kelompok yang menerima SH-MSCs, terutama pada dosis 60 μ L. Hal ini mengindikasikan tren proteksi SH-MSCs terhadap inflamasi pada otot yang mengalami degenerasi, sekalipun perbedaan tersebut belum mencapai signifikansi statistik pada sampel yang digunakan.

Tren penurunan TNF- α pada kelompok yang menerima SH-MSCs selaras dengan perubahan kadar Myostatin, karena kedua marker tersebut saling terkait dalam jalur katabolisme otot, di mana penekanan inflamasi dapat berdampak pada reduksi ekspresi penghambat pertumbuhan otot. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok mencit sehat (K1) memiliki kadar Myostatin terendah, yaitu $3,31 \pm 0,41$ pg/mL, yang mencerminkan kondisi fisiologis normal di mana Myostatin berfungsi untuk menjaga keseimbangan pertumbuhan dan degradasi otot.³⁷ Nilai ini menunjukkan bahwa pada otot sehat, aktivitas Myostatin relatif rendah, sehingga memungkinkan proses sintesis protein dan regenerasi otot tetap berjalan normal. Fenomena ini mendukung teori bahwa Myostatin berperan sebagai regulator negatif homeostasis otot,³⁷ yaitu pada kadar yang terlalu tinggi, seperti pada K2, menyebabkan penurunan massa otot, sementara kadar normal pada K1 menunjukkan fungsi otot yang terjaga.

Kelompok kontrol negatif (K2) dan kelompok SH-MSCs 30 μ L (K3) memiliki kadar myostatin yang sama, yaitu 3,69 pg/mL. Hal ini menandakan bahwa pemberian SH-MSCs pada dosis 30 μ L belum mampu menurunkan ekspresi Myostatin secara signifikan. Mekanisme yang mendasari hal ini kemungkinan

terkait dengan jumlah faktor bioaktif dalam secretome yang diberikan masih terbatas, sehingga tidak cukup untuk menekan jalur katabolik otot yang diaktifkan oleh dexamethasone, termasuk jalur SMAD2/3 yang mengatur ekspresi Myostatin.^{34,81} Selain itu, efek SH-MSCs bersifat dosis-respons, di mana dosis rendah dapat mulai memberikan efek antiinflamasi, tetapi belum cukup kuat untuk mengurangi ekspresi faktor katabolik seperti Myostatin.¹⁰ Hal ini konsisten dengan temuan pada kelompok SH-MSCs 60 μ L (K4), di mana kadar Myostatin mulai menurun menjadi 3,59 pg/mL, menunjukkan efek protektif yang lebih nyata pada dosis lebih tinggi. Faktor lain yang dapat berkontribusi adalah variasi biologis individu mencit, yang dapat memengaruhi respons terhadap SH-MSCs. Meskipun terdapat sedikit penurunan pada kelompok yang menerima SH-MSCs 60 μ L (K4), hasil analisis statistik *One Way ANOVA* menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan antar seluruh kelompok ($p=0,133$), sehingga secara statistik kadar myostatin tetap serupa di semua perlakuan.

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan yang perlu diperhatikan dalam interpretasi hasil. Pertama, jumlah sampel pada masing-masing kelompok relatif terbatas ($n=7-10$), sehingga variasi biologis antar individu dapat memengaruhi hasil dan menurunkan kemampuan analisis statistik untuk mendeteksi perbedaan signifikan, khususnya pada parameter TNF- α dan Myostatin yang menunjukkan deviasi standar cukup besar.⁸²

Kedua, penelitian ini hanya menilai efek SH-MSCs dalam jangka waktu pendek setelah pemberian perlakuan, sehingga dampak jangka panjang terhadap

modulasi $\text{TNF-}\alpha$, Myostatin, dan regenerasi otot tidak dapat dipastikan. Hal ini membatasi pemahaman tentang potensi terapeutik SH-MSCs dalam kondisi sarcopenia kronis. Ketiga, variasi biologis individu mencit, termasuk respons imun dan metabolisme jaringan otot, dapat turut memengaruhi hasil pengukuran dan menambah variasi data, sehingga hasil antar hewan tidak sepenuhnya homogen dan dapat memengaruhi interpretasi efektivitas perlakuan SH-MSCs. Penelitian selanjutnya disarankan untuk menggunakan sampel lebih besar dan durasi perlakuan lebih panjang serta mengontrol lingkungan dan hewan coba lebih ketat sehingga variasi biologis individu dapat terkontrol dan efek SH-MSCs dievaluasi lebih komprehensif.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Pemberian SH-MSCs tidak berpengaruh signifikan terhadap kadar TNF- α dan Myostatin pada mencit betina galur C57BL/6 model sarcopenia yang diinduksi Dexamethasone.
2. Kadar TNF- α pada kelompok SH-MSCs 30 μ L ($190,37 \pm 50,79$ ng/L) dan 60 μ L ($186,87 \pm 35,98$ ng/L) lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif ($246,00 \pm 33,62$ ng/L). Sedangkan kadar myostatin pada kelompok SH-MSCs 30 μ L ($3,69 \pm 0,15$ pg/mL) sama dengan kelompok kontrol negatif ($3,69 \pm 0,18$ pg/mL), dan kadar myostatin sedikit lebih rendah pada kelompok SH-MSCs 60 μ L ($3,59 \pm 0,39$ pg/mL). Kadar TNF- α maupun Myostatin antar kelompok tidak berbeda secara signifikan secara statistik.
3. Peningkatan kadar TNF- α pada kelompok kontrol negatif (K2) sejalan dengan kadar myostatin yang tinggi, sedangkan pada kelompok SH-MSCs 30 μ L TNF- α menurun tetapi myostatin tetap sama. Pada kelompok SH-MSCs 60 μ L, penurunan TNF- α diikuti oleh penurunan myostatin, menunjukkan korelasi positif antara peradangan sistemik dan ekspresi penghambat pertumbuhan otot dalam model sarcopenia yang lebih nyata pada dosis tinggi.
4. Pemberian SH-MSCs berpotensi menurunkan kadar TNF- α , sitokin proinflamasi utama, pada kedua dosis (30 μ L dan 60 μ L), meskipun

penurunan ini tidak signifikan secara statistik. Sementara itu, pengaruh SH-MSCs terhadap myostatin, penghambat pertumbuhan otot, terlihat pada dosis tinggi (60 μ L), di mana kadar mulai menurun dibandingkan kontrol negatif, sedangkan dosis rendah (30 μ L) belum mampu menurunkan myostatin.

6.2 Saran

1. Penelitian selanjutnya disarankan untuk meningkatkan jumlah sampel pada setiap kelompok, sehingga variasi biologis individu dapat diminimalkan dan kekuatan statistik untuk mendeteksi perbedaan antar kelompok menjadi lebih tinggi.
2. Durasi perlakuan sebaiknya diperpanjang agar efek jangka panjang terhadap modulasi TNF- α , Myostatin, serta regenerasi otot dapat diamati secara menyeluruh, sehingga potensi terapeutik SH-MSCs pada kondisi sarcopenia dapat dievaluasi lebih akurat.
3. Kontrol terhadap lingkungan dan kondisi hewan coba perlu diperketat, termasuk monitoring kondisi fisiologis, agar variasi biologis individu lebih terkendali dan efek perlakuan SH-MSCs dapat diukur dengan lebih valid dan konsisten.

DAFTAR PUSTAKA

1. Chang MC, Choo YJ. Effects of Whey Protein, Leucine, and Vitamin D Supplementation in Patients with Sarcopenia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*; 15. Epub ahead of print 1 February 2023. DOI: 10.3390/nu15030521.
2. Liu S, Zhang L, Li S. Advances in nutritional supplementation for sarcopenia management. *Frontiers in Nutrition*; 10. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.3389/fnut.2023.1189522.
3. Alqurashi HB, Robinson K, O'Connor D, et al. The effects of neuromuscular electrical stimulation on hospitalised adults: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Age Ageing*; 52. Epub ahead of print 1 December 2023. DOI: 10.1093/ageing/afad236.
4. Liu S, Zhang L, Li S. Advances in nutritional supplementation for sarcopenia management. *Frontiers in Nutrition*; 10. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.3389/fnut.2023.1189522.
5. Petermann-Rocha F, Balntzi V, Gray SR, et al. Global prevalence of sarcopenia and severe sarcopenia: a systematic review and meta-analysis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2022; 13: 86–99.
6. Petermann-Rocha F, Balntzi V, Gray SR, et al. Global prevalence of sarcopenia and severe sarcopenia: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2022; 13: 86–99.
7. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, et al. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*; 18. Epub ahead of print 1 September 2017. DOI: 10.3390/ijms18091852.
8. Irawan RCS, Putra A, Setyo T, et al. Secretome hypoxia-mesenchymal stem cells decrease tumor necrosis factor- α and interleukin-18 in kidney of type 2 diabetes mellitus model rats. *Universa Medicina* 2023; 42: 320–328.
9. Sandonà M, Di Pietro L, Esposito F, et al. Mesenchymal Stromal Cells and Their Secretome: New Therapeutic Perspectives for Skeletal Muscle Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*; 9. Epub ahead of print 13 May 2021. DOI: 10.3389/fbioe.2021.652970.
10. Sari MI, Jusuf NK, Munir D, et al. The Role of Mesenchymal Stem Cell Secretome in the Inflammatory Mediators and the Survival Rate of Rat Model of Sepsis. *Biomedicines*; 11. Epub ahead of print 1 August 2023. DOI: 10.3390/biomedicines11082325.
11. Langendorf EK, Rommens PM, Drees P, et al. Detecting the Effects of the Glucocorticoid Dexamethasone on Primary Human Skeletal Muscle Cells—Differences to the Murine Cell Line. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 2497.

12. Kartika RW, Sidharta VM, Djuartina T, et al. New Insight in Using of Mesenchyme Stem Cell Conditioning Medium for the Impaired Muscle related Biomarkers: In vivo Study with Rat Model. *Ann Afr Med* 2024; 23: 674–679.
13. Li Y-P, Reid MB. *NF-B mediates the protein loss induced by TNF-in differentiated skeletal muscle myotubes*, <http://www.ajpregu.org> (2000).
14. St. Andre M, Johnson M, Bansal PN, et al. A mouse anti-myostatin antibody increases muscle mass and improves muscle strength and contractility in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy and its humanized equivalent, domagrozumab (PF-06252616), increases muscle volume in cynomolgus monkeys. *Skelet Muscle*; 7. Epub ahead of print 9 November 2017. DOI: 10.1186/s13395-017-0141-y.
15. Gupta D, Zickler AM, El Andaloussi S. Dosing extracellular vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 178. Epub ahead of print 1 November 2021. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113961.
16. Pham S, Puckett Y. Physiology, Skeletal Muscle Contraction. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL)*. StatPearls Publishing, 2023.
17. Hafen B, Burns B. Physiology, Smooth Muscle. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL)*. StatPearls Publishing, 2023.
18. Ripa R, George T, Shumway K, et al. Physiology, Cardiac Muscle. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL)*. StatPearls Publishing, 2023.
19. Kuo IY, Ehrlich BE. Signaling in Muscle Contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7: a006023.
20. Brunello E, Fusi L. Regulating Striated Muscle Contraction: Through Thick and Thin. *Annu Rev Physiol* 2024; 86: 255–275.
21. Van Every DW, D'Souza AC, Phillips SM. Hormones, Hypertrophy, and Hype: An Evidence-Guided Primer on Endogenous Endocrine Influences on Exercise-Induced Muscle Hypertrophy. *Exerc Sport Sci Rev* 2024; 52: 117–125.
22. Zhao Y-C. Dual roles of mTOR in skeletal muscle adaptation: coordinating hypertrophic and mitochondrial biogenesis pathways for exercise-induced chronic disease management. *Front Med (Lausanne)*; 12. Epub ahead of print 29 August 2025. DOI: 10.3389/fmed.2025.1635219.
23. Xu J, Velleman SG. Critical role of the mTOR pathway in poultry skeletal muscle physiology and meat quality: an opinion paper. *Front Physiol*; 14. Epub ahead of print 5 July 2023. DOI: 10.3389/fphys.2023.1228318.
24. Tezze C, Sandri M, Tessari P. Anabolic Resistance in the Pathogenesis of Sarcopenia in the Elderly: Role of Nutrition and Exercise in Young and Old People. *Nutrients* 2023; 15: 4073.
25. Torres N, Tobón-Cornejo S, Velazquez-Villegas LA, et al. Amino Acid Catabolism: An Overlooked Area of Metabolism. *Nutrients* 2023; 15: 3378.
26. Pang X, Zhang P, Chen X, et al. Ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle atrophy. *Front Physiol*; 14. Epub ahead of print 17 November 2023. DOI: 10.3389/fphys.2023.1289537.

27. Verberne AJM, Korim WS, Sabetghadam A, et al. Adrenaline: insights into its metabolic roles in hypoglycaemia and diabetes. *Br J Pharmacol* 2016; 173: 1425–1437.
28. Sharma B, Dabur R. Role of Pro-inflammatory Cytokines in Regulation of Skeletal Muscle Metabolism: A Systematic Review. *Curr Med Chem* 2020; 27: 2161–2188.
29. Antuña E, Cachán-Vega C, Bermejo-Millo JC, et al. Inflammaging: Implications in Sarcopenia. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 15039.
30. Huang W-F, Chen Y-C, Chang C-S, et al. Definition and diagnosis of sarcopenia: Asia-Pacific perspectives. *Osteoporos Sarcopenia* 2025; 11: 2–10.
31. Ryan AS, Li G. Skeletal muscle myostatin gene expression and sarcopenia in overweight and obese middle-aged and older adults. *JCSM Clin Rep*; 6. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1002/crt2.43.
32. Sartori R, Romanello V, Sandri M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nature Communications*; 12. Epub ahead of print 1 December 2021. DOI: 10.1038/s41467-020-20123-1.
33. Huo F, Liu Q, Liu H. Contribution of muscle satellite cells to sarcopenia. *Frontiers in Physiology*; 13. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.3389/fphys.2022.892749.
34. Mankhong S, Kim S, Moon S, et al. Experimental Models of Sarcopenia: Bridging Molecular Mechanism and Therapeutic Strategy. *Cells*; 9. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.3390/cells9061385.
35. Aravena J, Abrigo J, Gonzalez F, et al. Angiotensin (1-7) Decreases Myostatin-Induced NF- κ B Signaling and Skeletal Muscle Atrophy. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 1167.
36. Manfredi LH, Paula-Gomes S, Zanon NM, et al. Myostatin promotes distinct responses on protein metabolism of skeletal and cardiac muscle fibers of rodents. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 50. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1590/1414-431x20176733.
37. Chen MM, Zhao YP, Zhao Y, et al. Regulation of Myostatin on the Growth and Development of Skeletal Muscle. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*; 9. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.3389/fcell.2021.785712.
38. Sriram S, Subramanian S, Juvvuna PK, et al. Myostatin Augments Muscle-Specific Ring Finger Protein-1 Expression Through an NF- κ B Independent Mechanism in SMAD3 Null Muscle. *Molecular Endocrinology* 2014; 28: 317–330.
39. Gonzalez Caldito N. Role of tumor necrosis factor- α in the central nervous system: a focus on autoimmune disorders. *Front Immunol*; 14. Epub ahead of print 7 July 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1213448.
40. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1975; 72: 3666–3670.
41. Bastos LL, Mariano D, Lemos RP, et al. The Role of Structural Bioinformatics in Understanding Tumor Necrosis Factor α -Interacting Protein Mechanisms in Chronic Inflammatory Diseases: A Review. *Immuno* 2024; 4: 14–42.

42. Pijet B, Pijet M, Litwiniuk A, et al. TNF- α and IFN- γ -Dependent Muscle Decay Is Linked to NF- κ B- and STAT-1 α -Stimulated Atrogin1 and MuRF1 Genes in C2C12 Myotubes. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 1–18.
43. Shirakawa T, Rojasawasthien T, Inoue A, et al. Tumor necrosis factor alpha regulates myogenesis to inhibit differentiation and promote proliferation in satellite cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2021; 580: 35–40.
44. Ye J. Obesity-Associated Chronic Inflammation: A Protective Mechanism against Type 2 Diabetes. *Immune Discovery* 2025; 1: 10007–10007.
45. Wang BY-H, Hsiao AW-T, Wong N, et al. Is dexamethasone-induced muscle atrophy an alternative model for naturally aged sarcopenia model? *J Orthop Translat* 2023; 39: 12–20.
46. Stratos I, Behrendt AK, Anselm C, et al. Inhibition of TNF- α Restores Muscle Force, Inhibits Inflammation, and Reduces Apoptosis of Traumatized Skeletal Muscles. *Cells*; 11. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.3390/cells11152397.
47. Baig MH, Ahmad K, Moon JS, et al. Myostatin and its Regulation: A Comprehensive Review of Myostatin Inhibiting Strategies. *Frontiers in Physiology*; 13. Epub ahead of print 23 June 2022. DOI: 10.3389/fphys.2022.876078.
48. Rodgers BD, Ward CW. Myostatin/Activin Receptor Ligands in Muscle and the Development Status of Attenuating Drugs. *Endocr Rev* 2022; 43: 329–365.
49. Tan L, Liu X, Dou H, et al. Characteristics and regulation of mesenchymal stem cell plasticity by the microenvironment — specific factors involved in the regulation of MSC plasticity. *Genes Dis* 2022; 9: 296–309.
50. Fonseca LN, Bolívar-Moná S, Agudelo T, et al. Cell surface markers for mesenchymal stem cells related to the skeletal system: A scoping review. *Heliyon*; 9. Epub ahead of print 1 February 2023. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e13464.
51. Wang C, Wu Y, Jiang J. The role and mechanism of mesenchymal stem cells in immunomodulation of type 1 diabetes mellitus and its complications: recent research progress and challenges: a review. *Stem Cell Res Ther* 2025; 16: 308.
52. Matwiejuk M, Miklosz A, Myśliwiec H, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and their derivatives in inflammatory skin diseases: a systematic review. *Front Immunol*; 16. Epub ahead of print 22 August 2025. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1617157.
53. Margiana R, Markov A, Zekiy AO, et al. Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review. *Stem Cell Research and Therapy*; 13. Epub ahead of print 1 December 2022. DOI: 10.1186/s13287-022-03054-0.
54. Weiss ARR, Dahlke MH. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front Immunol*; 10. Epub ahead of print 4 June 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01191.
55. Gumede DB, Abrahamse H, Houreld NN. Targeting Wnt/ β -catenin signaling and its interplay with TGF- β and Notch signaling pathways for the treatment of chronic wounds. *Cell Communication and Signaling* ; 22. Epub ahead of print 26 April 2024. DOI: 10.1186/s12964-024-01623-9.

56. González-González A, García-Sánchez D, Dotta M, et al. Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World J Stem Cells*; 12. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.4252/wjsc.v12.i12.1529.
57. Arfianti A, Ulfah U, Hutabarat LS, et al. Hipoxia modulates the secretion of growth factors in of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Biomedicine (Taipei)* 2023; 13: 49–56.
58. Sengun E, Fröberg J, He X, et al. Mesenchymal stem cells suppress NF- κ B and ERK signalling while enhancing chemotaxis in CD4⁺ T cells. *Sci Rep* 2025; 15: 32000.
59. Luthfin Amellia N, Dewi Antari A, Nazar MA, et al. *Regulatory Effect of Secretome-Hypoxia Mesenchymal Stem Cells on TNF- α Level in Streptozotocin-induced Rats*. 2023.
60. Han Y, Yang J, Fang J, et al. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2022; 7: 92.
61. Meiliana A, Dewi NM, Wijaya A. Mesenchymal stem cell secretome: Cell-free therapeutic strategy in regenerative medicine. *Indonesian Biomedical Journal* 2019; 11: 113–124.
62. Johnson D, Lopez M, Kelley B. Dexamethasone. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL)*. StatPearls Publishing, 2025.
63. Wang BYH, Hsiao AWT, Wong N, et al. Is dexamethasone-induced muscle atrophy an alternative model for naturally aged sarcopenia model? *J Orthop Translat* 2023; 39: 12–20.
64. Amy Y. Sato, Danielle Richardson, Meloney Cregor, et al. Glucocorticoids Induce Bone and Muscle Atrophy by Tissue-Specific Mechanisms Upstream of E3 Ubiquitin Ligases. *Endocrinology*. Epub ahead of print 9 January 2017. DOI: 10.1210/en.2016-1779.
65. Núñez-Robainas A, Guitart M, López-Postigo A, et al. Myostatin/Smad2/Smad3 pathway define a differential clinical phenotype in COPD-associated sarcopenia. *ERJ Open Res* 2025; 11: 00772–02024.
66. Wiedmer P, Jung T, Castro JP, et al. Sarcopenia – Molecular mechanisms and open questions. *Ageing Research Reviews*; 65. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101200.
67. Li W, Liu Q, Shi J, et al. The role of TNF- α in the fate regulation and functional reprogramming of mesenchymal stem cells in an inflammatory microenvironment. *Frontiers in Immunology*; 14. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1074863.
68. Phinney DG, Di Giuseppe M, Njah J, et al. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nat Commun*; 6. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1038/ncomms9472.
69. Grafe I, Alexander S, Peterson JR, et al. TGF- β family signaling in mesenchymal differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 10. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1101/cshperspect.a022202.

70. Ko JH, Oh JY. Mesenchymal stromal cells regulate THP-1–differentiated macrophage cytokine production by activating Akt/mammalian target of rapamycin complex 1 pathway. *Cytotherapy*; 25. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.1016/j.jcyt.2023.03.013.
71. Sakuma K, Aoi W, Yamaguchi A. The intriguing regulators of muscle mass in sarcopenia and muscular dystrophy. *Front Aging Neurosci*; 6. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.3389/fnagi.2014.00230.
72. Swarjana IK. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Yogyakarta: ANDI, 2023.
73. Lumban Gaol LM, Purba A, Diposarosa R, et al. Role of Hypoxic Secretome from Mesenchymal Stem Cells in Enhancing Tissue Repair: Regulatory Effects on HIF-1 α , VEGF, and Fibroblast in a Sphincterotomy Rat Model. *Journal of Inflammation Research* 2024; 17: 7463–7484.
74. Silvana S, Japardi I, Rusda M, et al. Secretome from hypoxic mesenchymal stem cells as a potential therapy for ischemic stroke: Investigations on VEGF and GFAP expression. *Narra J*; 4. Epub ahead of print 1 December 2024. DOI: 10.52225/narra.v4i3.1181.
75. Kretschmer T, Schulze-edinghausen M, Turnwald EM, et al. Effect of maternal obesity in mice on IL-6 levels and placental endothelial cell homeostasis. *Nutrients*; 12. Epub ahead of print 1 February 2020. DOI: 10.3390/nu12020296.
76. Ascenzi F, Barberi L, Dobrowolny G, et al. Effects of IGF-1 isoforms on muscle growth and sarcopenia. *Aging Cell*; 18. Epub ahead of print 1 June 2019. DOI: 10.1111/acer.12954.
77. Howard EE, Pasiakos SM, Blesso CN, et al. Divergent Roles of Inflammation in Skeletal Muscle Recovery From Injury. *Front Physiol*; 11. Epub ahead of print 13 February 2020. DOI: 10.3389/fphys.2020.00087.
78. Oh S, Yang J, Park C, et al. Dieckol Attenuated Glucocorticoid-Induced Muscle Atrophy by Decreasing NLRP3 Inflammasome and Pyroptosis. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 8057.
79. Dabrowska S, Andrzejewska A, Janowski M, et al. Immunomodulatory and Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles: Therapeutic Outlook for Inflammatory and Degenerative Diseases. *Front Immunol*; 11. Epub ahead of print 5 February 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2020.591065.
80. Ferrini F, Juárez EH, Merighi A. Does mesenchymal stem cell's secretome affect spinal sensory circuits? Implication for pain therapies. *Neural Regen Res* 2025; 20: 181–183.
81. Witt R, Weigand A, Boos AM, et al. Mesenchymal stem cells and myoblast differentiation under HGF and IGF-1 stimulation for 3D skeletal muscle tissue engineering. *BMC Cell Biol* 2017; 18: 15.
82. Netz Y, Lidor R, Ziv G. Small samples and increased variability – discussing the need for restricted types of randomization in exercise interventions in old age. *European Review of Aging and Physical Activity* 2019; 16: 17.