

**PERUBAHAN EKSPRESI TENASIN-C, JUMLAH, DAN
DIAMETER SERAT OTOT GASTROKNEMIUS DAN SOLEUS
TIKUS USIA 1 HARI, 3 BULAN, DAN 12 BULAN**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
MAGISTER ILMU BIOMEDIK (M. BIOMED.)**

**dr. VERONIKA MARIA SIDHARTA
0606000251**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN HISTOLOGI
JAKARTA
JUNI 2009**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Veronika Maria Sidharta
NPM : 0606000251



Tanggal : 23 Juni 2009

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : dr. Veronika Maria Sidharta
NPM : 0606000251
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Perubahan Ekspresi Tenasin-C, Jumlah, dan Diameter Serat Otot Gastroknemius dan Soleus Tikus Usia 1 Hari, 3 Bulan, dan 12 Bulan

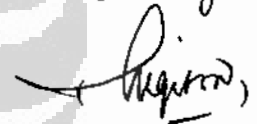
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Ilmu Biomedik pada program studi Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : dr. Isnani A. Suryono, M.S.



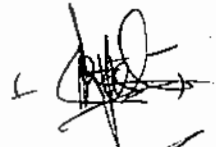
Pembimbing II : dr. Sugito Wonodirekso, M.S.



Penguji I : dr. Ahmad Aulia Jusuf, Ph.D.



Penguji II : Dr. dr. Primariadewi Rustamadji, M.M., Sp.P.A.



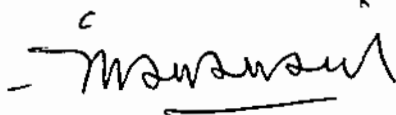
Penguji III : Prof. Dr. dr. Nukman Moeloek, Sp.And.



Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 1 Juli 2009

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik



Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi

UCAPAN TERIMA KASIH

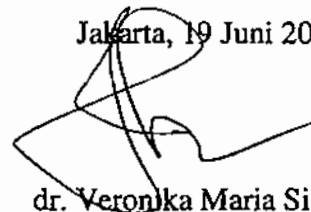
Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar MAGISTER ILMU BIOMEDIK (M. BIOMED.) program studi Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada :

1. dr. Isnani A. Suryono, MS selaku Pembimbing Akademik dan Pembimbing I, untuk seluruh waktu, bimbingan, dedikasi pemikiran, bantuan dan dukungan moral maupun material selama belajar di Program Magister Ilmu Biomedik FKUI ini.
2. dr. Sugito Wonodirekso, MS selaku Pembimbing II, yang telah memberikan ide penelitian, ilmu, nasihat, diskusi yang menarik, contoh yang baik, kesabarannya terhadap saya, serta dukungan moral maupun materialnya selama ini.
3. Prof. dr. Jeanne Adiwinata Pawitan, PhD, selaku Ketua Kekhususan Histologi Program Magister Ilmu Biomedik FKUI sampai dengan tahun 2008, yang telah banyak memberikan bimbingan, ilmu, ide, nasihat, diskusi yang menarik, dan contoh yang baik, serta dukungan moral maupun materialnya.
4. dr. Ahmad Aulia Jusuf, PhD selaku Ketua Kekhususan Histologi Program Magister Ilmu Biomedik FKUI saat ini, yang telah banyak memberikan bimbingan, ilmu, ide, nasihat, diskusi yang menarik, dan contoh yang baik, serta dukungan moral maupun materialnya.
5. dr. Lia Damayanti, MS, SpPA, atas saran, masukan, dan bimbingan pada pewarnaan imunohistokimia.
6. dra. Ria Kodariah, MS, yang telah memberikan ilmu, saran, dan diskusi yang menarik.
7. Rektor Unika Atma Jaya, Prof. Dr. FG Winarno.

8. Dekan Fakultas Kedokteran Unika Atma Jaya, dr. Felicia Kurniawan, M.Kes, dan mantan Dekan FKUAJ, dr. Satya Joewana, SpKJ(K), serta para Wadek.
9. dr. Karim Susanto, MS, dr. Petrus Sugiarto, dr. Rendi Saputra, dr. Tan Fei Fan, dan dr. Ecie Budiyanti dari Departemen Histologi FKUAJ, atas dukungannya selama ini.
10. dr. R. Soeharto, SpTHT, dr. Soenanto Roewijoko, MS, SpA, dr. Atikah C. Barasila, MBiomed., dr. Rulliana Agustin, MMedEd, dr. Siti Nurhayati Setianingsih, dr. Dewi Sukmawati, MKes, atas suasana yang hangat dan akrab selama saya belajar di sini, sehingga proses belajar tidak terasa berat.
11. Ibu Isbandiyah, Bpk Dina S, Ibu Mini, Mas Kanto, Mas Mugi, Mbak Ike, atas suasana yang hangat dan akrab, bantuan, dukungan, serta kerja sama yang baik, sehingga proses belajar dan penelitian bisa berlangsung baik.
12. Kedua orang tua terkasih, Andreas Sidharta dan Retno Susilo, atas dukungan dan bantuan moral maupun material yang telah diberikan selama menjalani proses pendidikan Magister dan menyelesaikan penelitian ini.
13. Juergen Gunawan, suami teladan yang telah memberikan dukungan moral, material, dan semangatnya, sehingga seluruh proses pendidikan Magister dan penelitian dapat berjalan lancar sampai selesai. Buah hati, Gregorius Willhem Gunawan, yang telah rela membagi sebagian masa kebersamaan selama menyelesaikan proses pendidikan dan penelitian.
14. Para sahabat, rekan-rekan biomedik, terutama rekan satu kekhususan yaitu dr. Radiana Antarianto D, M.Biomed, atas bantuan, kerja sama, dan dukungannya selama ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan dan pengamalan ilmu pengetahuan.

Jakarta, 19 Juni 2009



dr. Veronika Maria Sidharta

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : dr. Veronika Maria Sidharta
NPM : 0606000251
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik
Departemen : Histologi
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis


demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

PERUBAHAN EKSPRESI TENASIN-C, JUMLAH, DAN DIAMETER SERAT OTOT GASTROKNEMIUS DAN SOLEUS TIKUS USIA 1 HARI, 3 BULAN, DAN 12 BULAN

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Jakarta
Pada tanggal: 19 Juni 2009
Yang menyatakan,



Veronika Maria Sidharta

Nama : Veronika Maria Sidharta
Program Studi : Program Magister Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Perubahan Ekspresi Tenasin-C, Jumlah, dan Diameter Serat Otot Gastroknemius dan Soleus Tikus Usia 1 Hari, 3 Bulan, dan 12 Bulan

ABSTRAK

Latar belakang: Otot rangka adalah jaringan yang dinamis. Proses perkembangan dan regenerasinya dipengaruhi oleh berbagai faktor pertumbuhan, antara lain tenasin-C. Tenasin-C adalah suatu glikoprotein heksabrakion matriks ekstrasel yang mempunyai subunit EGF-like. Tenasin-C berfungsi sebagai regulator berbagai fungsi sel. Ekspresinya dapat dilihat dengan cara imunohistokimia dan dinilai secara semikuantitatif dengan estimasi visual. Belum diketahui ekspresi tenasin-C pada jaringan otot rangka berkaitan dengan proses perkembangan dan korelasinya dengan jumlah dan diameter serat otot rangka. Diduga seiring bertambahnya usia akan terjadi penurunan ekspresi tenasin-C dan bertambahnya jumlah dan diameter serat otot. Diharapkan di kemudian hari dapat dikembangkan terapi kerusakan atau kelainan otot melalui optimalisasi regenerasi serat otot dengan pemberian tenasin-C eksogen.

Metode: Desain penelitian ini adalah perbandingan potong lintang dengan subyek tikus Sprague-Dawley jantan usia 1-4 hari, 3-4 bulan, dan 12-16 bulan. Sediaan mikroskopik diwarnai dengan hematoksin-eosin dan imunohistokimia TNC. Fotomikrograf dianalisis dengan Digimizer Image Analyzer. Analisis imunoreaktivitas TNC dilakukan berdasarkan intensitas pewarnaan dan pola ekspresi.

Hasil: Terdapat penambahan jumlah dan diameter serat otot rangka dari kelompok usia 1-4 hari sampai kelompok usia 12-16 bulan. Ekspresi TNC ditemukan pada otot rangka semua kelompok umur. Ekspresi kuat terhadap TNC paling sering ditemukan di kelompok usia 1-4 hari. Ekspresi negatif dan ekspresi lemah paling sering ditemukan di kelompok usia 12-16 bulan. Ditemukan korelasi positif yang bermakna antara pola ekspresi ekstrasel TNC dengan jumlah dan diameter serat, dan juga antara ekspresi lemah TNC dengan jumlah dan diameter serat otot rangka. Korelasi negatif yang bermakna ditemukan antara pola ekspresi intrasel dengan jumlah dan diameter serat, serta antara pola ekspresi kombinasi dengan jumlah dan diameter serat. Selain itu terdapat korelasi negatif antara ekspresi TNC yang sedang dengan jumlah dan diameter serat, serta antara ekspresi TNC yang kuat dengan jumlah dan diameter serat otot rangka.

Kesimpulan: Seiring bertambahnya usia otot rangka, akan terjadi peningkatan jumlah dan diameter serat otot rangka. Ekspresi TNC didapatkan pada semua kelompok usia, terutama kelompok usia 1-4 hari. Pada proses perkembangan otot rangka akan terjadi penurunan dan perubahan pola ekspresi TNC. Terdapat korelasi antara ekspresi TNC dengan jumlah dan diameter serat otot rangka.

Kata kunci: perkembangan otot rangka, jumlah serat, diameter serat, tenasin-C

Name : Veronika Maria Sidharta
Study Program : Postgraduate Program of Biomedical Science
Thesis Title : Changes in Expression of Tenascin-C, Muscle Fiber Number and Diameter of Gastrocnemius and Soleus Muscles in Rats Aged 1 Day, 3 Months, and 12 Months.

ABSTRACT

Background: Skeletal muscle is a dynamic tissue. Its development and regeneration processes are influenced by various growth factors. Amongst those factors is tenascin-C (TNC). TNC is one of the extracellular matrix glycoprotein with EGF-like subunit. TNC acts as regulator for several cell functions. Its expression can be detected immunohistochemically and analyzed semiquantitatively using visual estimation. TNC expression in skeletal muscle related with developmental process and its correlation with skeletal muscle fiber number and diameter is, to date, not yet known. The preferred hypothesis is with increasing age, there will be decreasing TNC expression and increment of skeletal muscle fiber number and diameter.

Methods: This is a comparative cross-sectional study. Subjects are male Sprague-Dawley rats, divided into 3 age groups: 1-4 days, 3-4 months, and 12-16 months. Microscopic specimens were made and stained with hematoxylin-eosin and TNC immunohistochemistry. Microphotographs were analysed using Digimizer Image Analyzer. Immunoreactivity of TNC was classified based on staining intensity and expression pattern.

Result: There is an increase in skeletal muscle fiber number and diameter from 1 day to 16 months. TNC expression was positive in all age groups. Strong TNC expression was found in 1-4 day-old group. Negative and weak expressions were found mostly in adult group. There is a positive correlation between TNC extracell expression pattern with muscle fiber number and diameter, and also between TNC weak expression with muscle fiber number and diameter. Negative correlations were found between intracell expression pattern with muscle fiber number and diameter, and also between and combination expression pattern with fiber number and diameter. Negative correlations were also found between moderate TNC expressions with muscle fiber number and diameter, and between strong TNC expressions with muscle fiber number and diameter..

Conclusion: With advancing age, the skeletal muscle fiber number and diameter increases. TNC expression was positive in all age groups, especially group 1-4 day-old. But with increasing age, the expression became less intense and there is a change in the pattern of expression. There is correlation between TNC expression with skeletal muscle fiber number and diameter.

Keyword: skeletal muscle development, fiber number, fiber diameter, tenascin-C

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR GRAFIK.....	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Hipotesis Penelitian	3
1.4. Tujuan Penelitian	3
1.5. Manfaat Penelitian	4
1.6. Kerangka Teori	4
1.7. Kerangka Pola Pikir	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Otot Rangka	6
2.1.1. Histologi Otot Rangka.....	6
2.1.2. Pertumbuhan dan Regenerasi Otot Rangka.....	8
2.1.3. Proses Penuaan pada Otot Rangka	13
2.1.4. Sel Punca Pada Otot Rangka	15
2.1.4.1. Sel Satelit.....	16
2.1.4.2. Sel Punca Otot Rangka Lainnya.....	20
2.1.4.3. Lingkungan Mikro Sel Punca Otot Rangka.....	23
2.2. Tenasin-C	25
2.2.1. Peran Tenasin-C dalam Regenerasi Otot Rangka	29
2.2.1.1. Peran Tenasin-C dalam Miogenesis	28
2.2.1.2. Peran Tenasin-C pada Angiogenesis	30
2.2.1.3. Peran Tenasin-C pada Reinervasi	30
2.3. Tikus Sprague-Dawley.....	31
2.4. Prinsip Dasar Pewarnaan Imunohistokimia.....	33
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....	35
3.1. Desain Penelitian	35
3.2. Tempat Penelitian.....	35
3.3. Hewan Percobaan	35
3.4. Alat dan Bahan	37
3.5. Protokol Penelitian	38
3.5.1. Prosedur Pengambilan Otot Gastroknemius dan Otot Soleus.....	38

3.5.2. Proses Pembuatan Sediaan	39
3.5.3. Pewarnaan Hematoksin-Eosin.....	39
3.5.4. Pewarnaan Imunohistokimia Tenasin-C.....	39
3.6. Pengumpulan Data.....	40
3.7. Analisa Data	43
3.8. Alur Penelitian.....	43
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	44
4.1. Gambaran Histologi Otot Rangka Ketiga Kelompok Usia	44
4.2. Perbedaan Jumlah Serat Otot Rangka pada Ketiga Kelompok Usia	45
4.3. Perbedaan Diameter Serat Otot Rangka antara Ketiga Kelompok Usia	46
4.4. Ekspresi Tenasin-C pada Otot Rangka Ketiga Kelompok Usia.....	48
4.5. Hubungan antara Ekspresi Tenasin-C dengan Jumlah dan Diameter Serat Otot Rangka	55
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	59
5.1. Kesimpulan.....	59
5.2. Saran	59
Daftar Pustaka.....	60

Lampiran

- Lampiran 1: Keterangan Lolos Kaji Etik
- Lampiran 2: Rekapitulasi Data Penelitian
- Lampiran 3: Hasil Uji Statistik
- Lampiran 4: Draft Artikel untuk Publikasi
- Daftar Riwayat Hidup

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Perbedaan otot tipe kedut-lambat dan tipe kedut-cepat	8
Tabel 2.2. Penanda sel satelit	18
Tabel 2.3. Jumlah sel satelit di otot rangka berbagai usia dan tipe serat	19
Tabel 2.4. Data biologis tikus galur Sprague-Dawley	31
Tabel 2.5. Perbandingan usia tikus dengan usia manusia	32
Tabel 4.1. Jumlah serat otot rangka ketiga kelompok usia	45
Tabel 4.2. Diameter serat otot rangka ketiga kelompok usia	47
Tabel 4.3. Jumlah serat otot rangka yang menunjukkan ekspresi TNC negatif dan positif.....	49
Tabel 4.4. Perbandingan jumlah serat otot rangka dengan ekspresi TNC positif berdasarkan pola ekspresi	51
Tabel 4.5. Perbandingan jumlah serat otot rangka dengan ekspresi TNC positif berdasarkan intensitas pewarnaan.....	51
Tabel 4.6. Korelasi bivariat pola ekspresi TNC dengan jumlah dan diameter serat otot rangka	56
Tabel 4.7. Korelasi bivariat intensitas pewarnaan TNC dengan jumlah dan diameter serat otot rangka	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Perbedaan otot tipe kedut-lambat dan tipe kedut-cepat	7
Gambar 2.2. Reaksi seluler pada pembentukan otot rangka embrional yang terulang pada proses regenerasi otot rangka.	10
Gambar 2.3. Proses perbaikan serat otot rangka.....	10
Gambar 2.4. Ekspresi Pax7 yang tinggi pada sel satelit dibandingkan pada inti serat otot	15
Gambar 2.5. Inti sel satelit dengan inti serat otot	17
Gambar 2.6. Skema proses regulasi sel satelit pada regenerasi serat otot rangka.....	20
Gambar 2.7. Kemungkinan sumber inti sel untuk regenerasi otot rangka.....	21
Gambar 2.8. Struktur Tenasin-C.....	26
Gambar 2.9. Proses imunohistokimia	34
Gambar 3.1. Skema anatomis tungkai belakang tikus	36
Gambar 3.2. Metode penghitungan jumlah dan diameter serat	42
Gambar 3.3. Ekspresi negatif (0), lemah (+1), sedang (+2), dan kuat (+3).....	42
Gambar 3.4. Pola ekspresi Tenasin-C.....	43
Gambar 4.1. Perbandingan gambaran histologis potongan melintang otot rangka tikus Sprague-Dawley pada ketiga kelompok usia (HE, 400x)	44
Gambar 4.2. Kontrol negatif dan hasil pewarnaan imunohistokimia TNC otot rangka tikus neonatus.....	48
Gambar 4.3. Kontrol negatif dan hasil pewarnaan imunohistokimia TNC otot rangka tikus remaja.....	48
Gambar 4.4. Kontrol negatif dan hasil pewarnaan imunohistokimia TNC otot rangka tikus dewasa.....	48

DAFTAR GRAFIK

Grafik 4.1.	Perbandingan jumlah serat otot gastroknemius dan soleus ketiga kelompok usia	45
Grafik 4.2.	Perbandingan diameter serat otot gastroknemius dan soleus ketiga kelompok usia	47
Grafik 4.3.	Perbandingan jumlah serat otot yang menunjukkan ekspresi TNC positif dan negatif pada otot gastroknemius ketiga kelompok usia	49
Grafik 4.4.	Perbandingan jumlah serat otot yang menunjukkan ekspresi TNC positif dan negatif pada otot soleus ketiga kelompok usia	50
Grafik 4.5.	Perbandingan pola ekspresi TNC pada otot gastroknemius ketiga kelompok usia	52
Grafik 4.6.	Perbandingan pola ekspresi TNC pada otot soleus ketiga kelompok usia	52
Grafik 4.7.	Perbandingan jumlah serat otot gastroknemius dengan ekspresi TNC positif berdasarkan intensitas pewarnaan.....	53
Grafik 4.8.	Perbandingan jumlah serat otot soleus dengan ekspresi TNC positif berdasarkan intensitas pewarnaan.....	54

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Otot rangka berperan sangat penting dalam kehidupan kita sehari-hari. Aktivitas kita sehari-hari, mulai dari gerakan motorik kasar seperti berdiri, menyeimbangkan tubuh dan berlari sampai gerakan motorik halus seperti menulis, melukis dan menjahit, tergantung pada otot rangka. Bahkan gerakan yang vital untuk kehidupan pun seperti bernafas dan mengunyah makanan juga tergantung pada otot rangka. Pemakaian otot rangka akan menyebabkan pengusangan, yang bila tidak diperbaiki akan mengakibatkan gangguan fungsi.

Sebelumnya serat otot rangka mamalia dewasa dikatakan sebagai jaringan yang telah terdiferensiasi penuh. Pertumbuhan jaringan otot rangka dianggap hanya disebabkan oleh hipertrofi.¹⁻³ Sekarang penelitian menunjukkan bahwa hiperplasia juga memegang peranan.^{2,3} Salah satu mekanisme hiperplasia melibatkan sel satelit.^{2,6-9} Berkat sel satelit ini pula, bila terjadi kerusakan serat otot rangka dapat memperbaiki diri sehingga tidak terjadi pengurangan massa otot. Proses pertumbuhan otot dan rangsangan pada otot, misalnya olah raga atau kerusakan, dapat mengaktifkan sel satelit.⁶

Proses pertumbuhan dan regenerasi otot rangka dipengaruhi oleh berbagai faktor pertumbuhan dan serangkaian peristiwa seluler, yang meregulasi sel satelit. Beberapa faktor telah diteliti perannya dalam regulasi proliferasi, diferensiasi, dan motilitas sel satelit. Tenasin-C merupakan salah satu molekul di matriks ekstrasel otot rangka yang diduga memiliki beberapa aksi antara lain meningkatkan kinerja sel satelit dalam proses regenerasi otot rangka, angiogenesis dan reinervasi taut neuromuskular.⁹⁻¹²

Tenasin-C (TNC) adalah suatu glikoprotein heksabrakion pada matriks ekstrasel yang antara subunit-subunitnya disatukan oleh ikatan disulfida.⁸⁻¹¹ Salah satu subunitnya mempunyai aktivitas mirip *epidermal growth factor (EGF-like)* dengan sifat dapat merangsang pertumbuhan.¹² Di antara molekul matriks ekstrasel, TNC dikenal sebagai regulator berbagai fungsi sel selama embriogenesis, penyembuhan luka atau perkembangan ke arah kanker.^{11,14} TNC

telah digunakan sebagai penanda lingkungan mikro sel punca neuron atau sel progenitor saraf di ventrikel otak/zona hipokampus.¹⁵ Ekspresi TNC bisa dilihat dengan cara imunohistokimia dan dinilai secara semikuantitatif dengan estimasi visual. Beberapa penelitian telah menunjukkan adanya korelasi antara ekspresi TNC dengan regenerasi pembuluh darah (angiogenesis) dan saraf.⁷⁻¹⁰

Komposisi otot rangka heterogen, terdiri dari berbagai serat dengan karakter histokimia dan fisiologis yang berbeda, yaitu serat tipe I (kedut lambat) dan tipe II (kedut cepat). Masing-masing tipe serat berfungsi untuk jenis aktivitas motorik yang berbeda. Serat tipe I cocok untuk kontraksi isometrik atau postural konsentrik lambat dan gerakan terbatas yang dapat bertahan lama, misalnya ketika kita mempertahankan posisi berdiri dalam waktu lama. Serat tipe II diperlukan untuk menghasilkan kekuatan yang besar dalam waktu singkat tapi tidak dapat bertahan lama, misalnya untuk lari *sprint*.¹⁶ Contoh serat tipe I adalah otot soleus, sedangkan contoh serat tipe II adalah otot gastroknemius. Kedua otot ini banyak digunakan untuk penelitian, salah satunya karena ukurannya cukup besar dan relatif mudah diambil atau dimanipulasi.

Ada berbagai pendapat mengenai perbedaan jumlah dan diameter otot rangka antar usia. Ada yang berpendapat bahwa jumlah serat otot rangka akan berkurang seiring bertambahnya usia dari lahir sampai tua. Penelitian-penelitian pada berbagai hewan menunjukkan adanya penurunan jumlah serat otot rangka dari usia muda ke dewasa. Di lain pihak ada juga yang justru tidak menemukan perubahan jumlah serat otot. Beberapa penelitian mendapatkan bahwa pada pertambahan usia akan terjadi atropi otot rangka. Ada pula yang justru tidak menemukan adanya perbedaan/penurunan diameter serat otot rangka. Penelitian-penelitian lain menunjukkan bahwa atropi otot akibat apoptosis pada usia tua dapat terjadi baik pada otot soleus maupun pada otot gastroknemius.¹⁷⁻²⁰

Ekspresi TNC pada jaringan muskuloskeletal normal terbatas, hanya di sekitar pembuluh-pembuluh darah dalam jaringan otot. Ekspresi TNC akan meningkat selama masa embriogenesis, proses regenerasi, dan penyembuhan. Bila terjadi kerusakan otot, ekspresi TNC akan meningkat pada daerah kerusakan. TNC diduga berfungsi menstimulasi proliferasi sel, kemungkinan sel satelit, dan juga membantu proses regenerasi otot. Pemahaman mengenai struktur dan fungsi

TNC dapat bermanfaat untuk terapi kerusakan otot di masa depan melalui pemberian TNC secara eksogen.^{7,8,21}

Karena hal-hal tersebut di atas, kami bermaksud melakukan penelitian terhadap tiga kelompok tikus, yaitu usia 1 hari, usia 3 bulan, dan usia 12 bulan. Belum diketahui perbedaan jumlah dan diameter serat otot serta ekspresi TNC otot gastroknemius dan otot soleus pada ketiga kelompok tikus tersebut. Kami akan menghitung jumlah dan diameter serta ekspresi TNC pada otot gastroknemius dan otot soleus.

1.2. Rumusan Masalah

- 1.2.1. Bagaimana ekspresi tenasin-C pada proses perkembangan otot rangka tikus?
- 1.2.2. Bagaimana perbedaan jumlah dan diameter serat otot rangka pada tiga kelompok usia 1 hari, 3 bulan, dan 12 bulan?
- 1.2.3. Bagaimana korelasi antara ekspresi tenasin-C dengan jumlah dan diameter otot rangka sehubungan dengan proses perkembangan?

1.3. Hipotesis Penelitian

- 1.3.1. Pertambahan usia akan menyebabkan penurunan ekspresi tenasin-C pada jaringan otot rangka tikus.
- 1.3.2. Terjadi peningkatan jumlah dan diameter serat otot rangka dari usia 1 hari sampai usia 12 bulan.
- 1.3.3. Terdapat korelasi antara ekspresi tenasin-C dengan jumlah dan diameter otot rangka.

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum

Melihat perubahan ekspresi tenasin-C berkaitan dengan perkembangan otot rangka

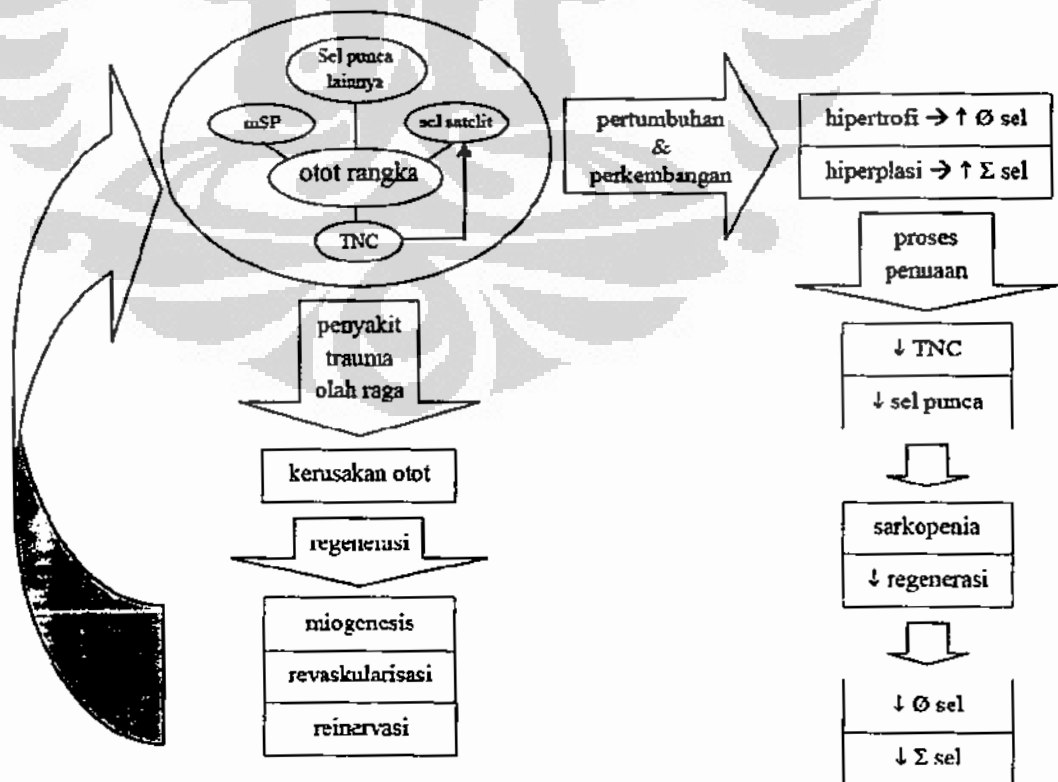
1.4.2. Tujuan Khusus

- 1.4.2.1. Mengetahui distribusi ekspresi tenasin-C pada jaringan otot rangka tikus kelompok usia 1 hari, 3 bulan, dan 12 bulan.
- 1.4.2.2. Mengetahui perbedaan jumlah dan diameter serat otot rangka tikus kelompok usia 1 hari, 3 bulan, dan 12 bulan.
- 1.4.2.3. Mencari korelasi antara ekspresi tenasin-C dengan jumlah dan diameter serat otot rangka tikus kelompok usia 1 hari, 3 bulan, dan 12 bulan.

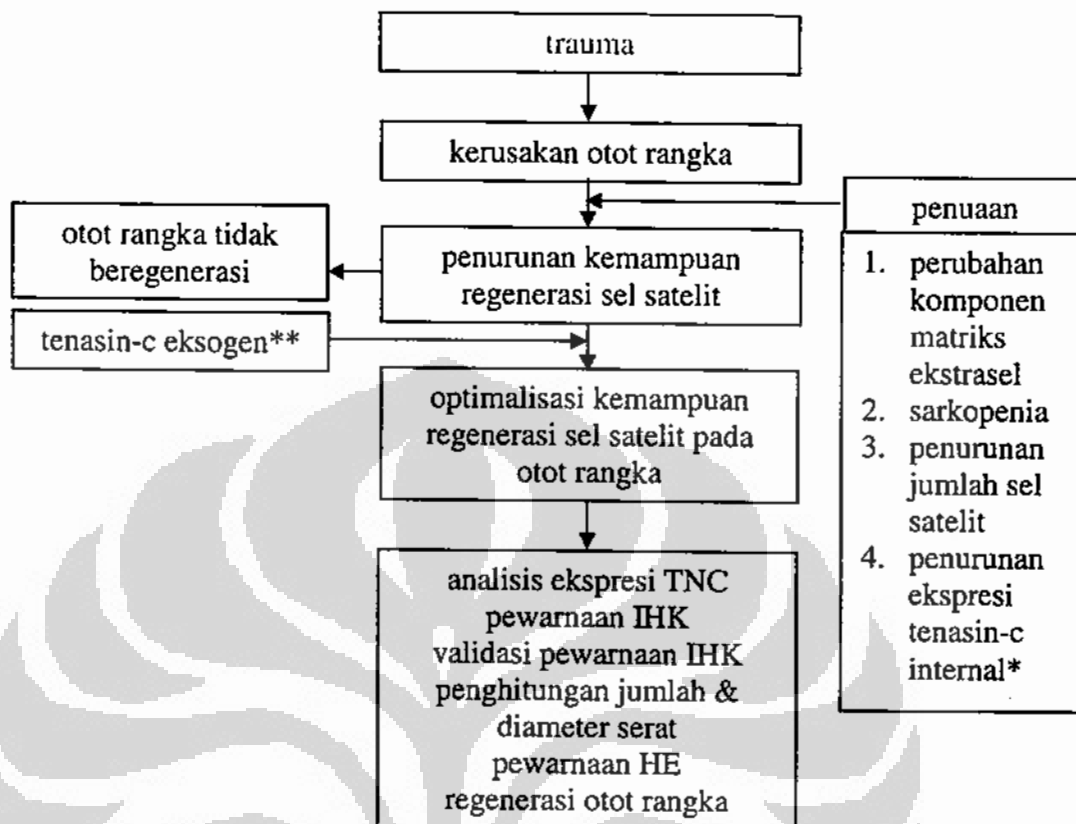
1.5. Manfaat Penelitian

Pemahaman tentang perubahan ekspresi tenasin-C pada jaringan otot rangka sehubungan dengan proses perkembangan dapat menjadi dasar pengembangan terapi kerusakan atau kelainan pada otot akibat trauma atau penuaan dengan cara mengoptimalkan kemampuan regenerasi sel satelit pada otot rangka melalui penambahan tenasin-C secara eksogen.

1.6. Kerangka Teori



1.7. Kerangka Pola Pikir



Keterangan:

* yang diteliti

** arah penelitian di masa depan

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Otot Rangka

2.1.1. Histologi Otot Rangka^{1-2,6}

Serat otot rangka berasal dari prekursornya yaitu mioblas, yang berjalan berjajar, ujung bertemu ujung, menyatu dan membentuk tabung yang disebut tabung otot. Di dalam tabung otot akan terbentuk miofibril, yang terdiri dari rangkaian miofilamen, yaitu suatu protein yang bertanggung jawab atas kemampuan kontraktile sel. Miofibril berbentuk silinder dengan diameter 1-2 μm , meluas sepanjang sel dan berjajar rapi secara paralel dengan miofibril lainnya, menyusun serat otot rangka. Susunan paralel yang teratur inilah yang menyebabkan tampilan 'berlurik', selang-seling garis terang dan gelap, yang merupakan ciri otot rangka bila dilihat dengan potongan longitudinal.

Serat otot tersusun paralel satu sama lain, dipendarahi oleh pembuluh-pembuluh kapiler pada ruang interseluler mereka yang saling berhubungan. Serat otot rangka berbentuk panjang, silindris, berinti banyak, dan berlurik. Diameter serat bervariasi dari 10 sampai 100 μm , bisa lebih kalau serat otot tersebut mengalami hipertrofi. Kekuatan relatif suatu serat otot tergantung pada diameter tersebut, sedangkan kekuatan keseluruhan jaringan otot tergantung jumlah dan ketebalan serat-serat yang menyusunnya.

Inti serat otot rangka terletak perifer persis di bawah membran sel. Sel satelit yang berukuran kecil, berinti tunggal dan berperan sebagai sel regeneratif, terletak pada cekungan dangkal di permukaan serat otot, di dalam lamina eksterna serat otot. Jaringan kromatin inti sel satelit lebih padat dan lebih kasar daripada jaringan kromatin inti serat otot.

Otot rangka tersusun dari serat-serat otot yang tersusun dalam fasikulus-fasikulus yang dapat dilihat dengan mata telanjang.¹ Serat otot merupakan unit kontraktile dasar jaringan otot. Keseluruhan otot diselubungi oleh epimisium, suatu jaringan ikat kolagen padat tidak teratur. Perimisium, suatu jaringan ikat kolagen yang tidak sepadat epimisium, menyelubungi berkas (fasikulus) serat otot.

Endomisium, terdiri dari serat retikular dan suatu lamina eksterna (lamina basalis), menyelubungi tiap serat otot.

Otot rangka berwarna merah muda sampai merah karena vaskularisasinya yang kaya sehingga terdapat pigmen mioglobin, suatu protein transport oksigen yang mirip hemoglobin tetapi lebih kecil. Berdasarkan diameter serat, jumlah mioglobin, jumlah mitokondria, luasnya retikulum sarkoplasmik, konsentrasi dari berbagai enzim, dan jumlah rata-rata kontraksi, serat otot dapat diklasifikasikan menjadi merah (kedut-lambat, tipe I), putih (kedut-cepat, tipe II), atau intermedia (Gambar 2.1, Tabel 2.1). Otot merah dapat berkontraksi dalam kurun waktu yang panjang dengan tenaga yang kecil, sedangkan otot putih berkontraksi cepat dan kuat tetapi cepat lelah. Biasanya sebuah otot, seperti biceps, memiliki ketiga jenis serat otot tersebut dalam proporsi yang relatif konstan, tergantung fungsi atau kerja otot tersebut. Pada ayam, contohnya, otot paha terutama terdiri dari serat merah dan otot dada terutama terdiri dari serat putih. Persarafan serat otot ternyata juga merupakan salah satu faktor yang akan menentukan jenis serat otot. Jika secara eksperimental persarafan serat otot ditukar, serat yang bersangkutan akan menyesuaikan diri dengan persarafan yang baru.¹

Gambar 2.1. Perbedaan otot tipe kedut-lambat dan tipe kedut-cepat



Sumber: Fawcett DW. Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology. 12th ed. New York: Chapman and Hall; 1994

Tabel 2.1. Perbedaan otot tipe kedut-lambat dan tipe kedut-cepat

Jenis serat	Putih (kedut-cepat, glikolitik)	Merah (kedut-lambat, oksidatif)	Intermedia (kedut-cepat, oksidatif, glikolitik)
Karakteristik struktural			
Warna	Putih	Merah	Merah muda
Diameter serat	Besar	Kecil	Sedang sampai kecil
Mitokondria	Sedikit	Banyak	Banyak
Densitas kapiler	Jarang	Banyak	Banyak
Karakteristik metabolik			
Kecepatan kedut	Cepat	Lambat	Cepat
Menjadi lelah	Cepat	Lambat	Sedang
Jalur utama sintesis ATP	Anaerobik	Aerobik	Aerobik
Aktivitas miosin ATPase	Cepat	Lambat	Cepat
Kandungan mioglobin	Rendah	Tinggi	Tinggi
Histokimia			
Kandungan glikogen	Tinggi	Rendah	Sedang
Kandungan lemak netral	Rendah	Tinggi	Sedang
ATPase, pH 9,4	Tinggi	Rendah	Tinggi
ATPase, pH 4,3	Rendah	Tinggi	Rendah
Dehidrogenase suksinat	Rendah	Tinggi	Sedang sampai tinggi
Dehidrogenase NADH	Rendah	Tinggi	Sedang sampai tinggi

Sumber: Fawcett DW. Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology. 12th ed. New York: Chapman and Hall; 1994, dengan perubahan

Persarafan otot rangka terdiri dari ujung saraf motorik (taut neuro-muskular) dan dua jenis ujung saraf sensorik (gelendong otot dan organ tendon Golgi). Kedua jenis ujung saraf sensorik ini berfungsi proprioseptif.

2.1.2. Pertumbuhan dan Regenerasi Otot Rangka

Pada pertumbuhan pascalahir, serat otot bertambah panjang dan tebal, hingga mencapai diameter 10-70 μm , tergantung jenis otot dan spesiesnya. Serat-serat otot dari otot yang samapun bisa bervariasi tebalnya. Pada masa dewasa, serat otot dapat mengalami peningkatan diameter lebih lanjut sebagai respons terhadap aktivitas otot yang terus-menerus, disebut hipertrofi akibat penggunaan (*hypertrophy*).¹

Hipertrofi otot bisa terjadi pada miofibril atau sarkoplasma. Hipertrofi miofibrilar disebabkan tegangan otot tingkat tinggi, sedangkan hipertrofi

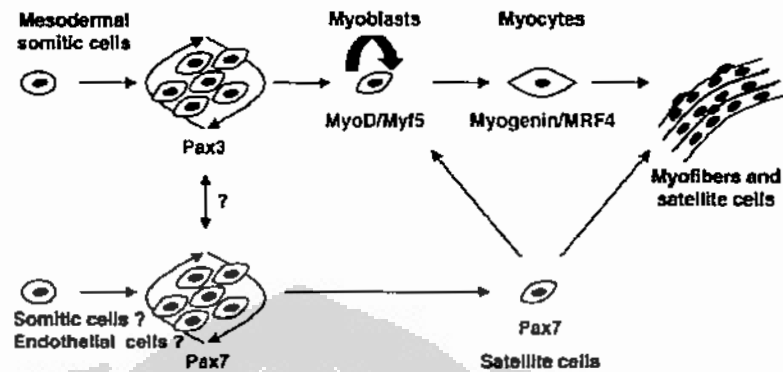
sarkoplasmik disebabkan kelelahan glikolitik tingkat tinggi. Olah raga beserta kerusakan dan deplesi yang disebabkan akan meningkatkan berbagai hormon seperti somatotropin (*growth hormone*, GH), somatomedin (terutama *insulin-like growth factor-1*, IGF-1), testosteron, dan insulin. Hormon-hormon ini akan meningkatkan sintesis protein anabolik dan penyerapan protein oleh serat otot. Sebaliknya serat otot juga bisa menjadi lebih tipis bila tidak digunakan dalam waktu cukup lama, misalnya akibat digips karena tulang patah, disebut atrofi akibat tidak digunakan (*disuse atrophy*).^{1,22}

Selain hipertrofi juga terjadi hiperplasia, yaitu penambahan jumlah serat otot.^{2,3} Ada dua mekanisme terjadinya hiperplasia otot. Pertama adalah pembelahan serat otot melalui pembelahan longitudinal serat otot.^{2,4,5} Kedua adalah pembentukan serat baru yang dihasilkan oleh sel satelit.^{2,6-9} Hiperplasia disebabkan oleh tegangan otot yang sangat tinggi disebabkan kontraksi dan peregangan.

Berkat adanya sel satelit ini pula, bila terjadi kerusakan serat otot rangka dapat memperbaiki diri sehingga tidak terjadi pengurangan massa otot. Proses pertumbuhan otot dan rangsangan pada otot, misalnya olah raga atau kerusakan, dapat mengaktifkan sel satelit yang kemudian akan mengalami serangkaian respons selular yang kesinambungan. Sel satelit berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi mioblas lalu miosit, berfusi satu sama lain atau dengan serat otot yang lama. Proses ini sama dengan yang terjadi pada masa embrional⁶ (Gambar 2.2). Dengan demikian terbentuklah serat otot rangka yang baru untuk menggantikan yang rusak.

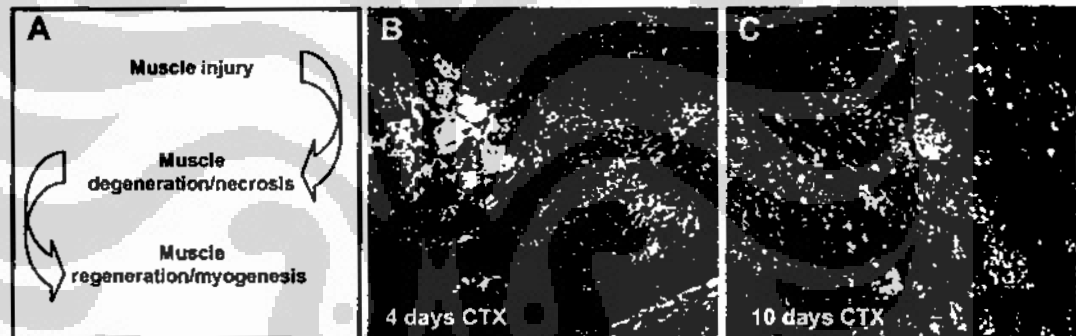
Pergantian inti serat otot rangka individu dewasa sangat pelan. Estimasi dengan bromodeoksiuridin (*bromodeoxyuridine/5-bromo-2-deoxyuridine/BrdU*) memperlihatkan tidak lebih dari 1-2% inti sel digantikan dengan yang baru tiap minggunya pada tikus. Kerusakan kecil yang disebabkan oleh penggunaan sehari-hari akan menyebabkan pergantian serat otot yang lambat. Sebaliknya kerusakan yang berat akan menyebabkan otot rangka mampu beregenerasi dengan cepat dan ekstensif. Regenerasi otot, apapun sebabnya, terjadi dalam dua tahap yaitu tahap degenerasi (nekrosis) dan tahap regenerasi (rekonstruksi) (Gambar 2.3).²²

Gambar 2.2. Reaksi seluler pada pembentukan otot rangka embrional yang terulang pada proses regenerasi otot rangka.



Sumber: Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84:209-238

Gambar 2.3. Proses perbaikan serat otot rangka.



A: fase degeneratif diikuti fase regeneratif; B: kerusakan otot tibialis anterior oleh kardiotoxin, terjadi nekrosis cepat dan aktivasi respons peradangan yang menyebabkan hilangnya arsitektur otot.; C: regenerasi serat otot ditandai aktivasi sel-sel miogenik yang akan berproliferasi, berdiferensiasi, dan berfusi ke serat yang nekrosis untuk memperbaiki, atau berfusi satu sama lain untuk pembentukan serat baru. Serat baru ditandai oleh ukurannya yang kecil dan inti yang terletak di tengah (panah).

Sumber: Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84:209-238

Pada tahap degenerasi, mula-mula terjadi nekrosis serat otot. Peristiwa ini secara umum dipicu oleh gangguan pada sarkolema serat otot yang mengakibatkan peningkatan permeabilitas serat otot. Gangguan tersebut dapat dilihat dari adanya peningkatan protein otot pada serum, seperti kreatin kinase. Hal-hal ini juga dapat disebabkan oleh stres mekanik seperti pada latihan fisik

yang berat dan juga pada penyakit degenerasi otot seperti distrofi otot. Diduga peningkatan influks kalsium setelah terjadi kerusakan sarkolema atau retikulum sarkoplasmik menyebabkan terganggunya homeostasis kalsium dan peningkatan proteolisis yang akhirnya menyebabkan terjadinya degenerasi jaringan. Akhirnya serat otot yang terganggu ini, tergantung kerusakan yang terjadi, akan mengalami autolisis fokal atau total.

Fase awal kerusakan otot biasanya disertai aktivasi sel mononuklir, terutama sel-sel peradangan dan sel-sel miogenik. Faktor-faktor yang dilepaskan otot yang rusak akan mengaktifasi sel-sel peradangan dalam otot, yang kemudian akan mengeluarkan sinyal kemotaktik untuk sel-sel peradangan yang bersirkulasi. Netrofil adalah sel peradangan yang pertama menginvasi otot yang rusak. Setelah itu makrofag menginfiltrasi daerah yang rusak untuk memfagosit debris sel dan mengaktifasi sel miogenik. Nekrosis serat otot dan peningkatan jumlah sel mononuklear non-otot pada daerah yang rusak adalah ciri histopatologis yang utama setelah terjadinya kerusakan otot.

Degenerasi otot diikuti aktivasi proses perbaikan otot. Proliferasi seluler merupakan hal yang penting dalam regenerasi otot. Ekspansi sel miogenik menjadi sumber inti serat otot baru yang cukup untuk perbaikan otot. Setelah fase proliferasi miogenik, serat otot baru dibentuk seperti pada masa embrionik. Sel miogenik berdiferensiasi dan berfusi ke tempat kerusakan untuk memperbaikinya atau berfusi satu sama lain membentuk serat otot yang baru. Gambaran histologis pada potongan melintang memperlihatkan serat otot yang baru terbentuk berukuran lebih kecil dan intinya terletak di daerah sentral. Serat otot yang baru tersebut sering bersifat basofilik, menunjukkan sintesis protein yang tinggi, dan mengekspresikan bentuk *myosin heavy chain* embrionik yang menunjukkan pembentukan serat baru. Pada potongan memanjang dan pada serat otot yang diisolasi, inti yang terletak sentral terlihat pada serat yang beregenerasi atau sepanjang serat yang baru, menandakan bahwa fusi sel tidak terjadi pada seluruh jaringan otot, hanya pada tempat terjadinya kerusakan. Setelah fusi miogenik terjadi secara lengkap, serat otot yang baru terbentuk akan membesar, dan inti akan bergerak ke bagian perifer serat otot. Dalam kondisi normal, otot yang baru

secara morfologis dan fungsional tidak dapat dibedakan dengan otot yang tidak mengalami kerusakan.

Remodeling otot melibatkan miogenesis, reinervasi, dan revaskularisasi. Proses ini diregulasi oleh berbagai jalur biokimia, antara lain yang diinisiasi oleh sitokin-sitokin peradangan, faktor-faktor pertumbuhan, dan jalur sinyal Notch, Wnt, dan Sonic Hedgehog (Shh). Jalur Notch secara umum meregulasi spesifikasi sel prekursor jaringan ke arah galur miogenik ketika faktor miogenik lainnya juga ada, antara lain faktor pertumbuhan fibroblas-2 (*fibroblast growth factor-2*, FGF-2). Wnt bekerja langsung pada progenitor miogenik, dan aktivasi rangkaian sinyal ini akan menyebabkan transisi progenitor dari fase proliferasi menjadi fase diferensiasi selama miogenesis pasca lahir. Pengiriman sinyal Wnt penting pada pembentukan otot selama embriogenesis dan juga pada diferensiasi miogenik dan penentuan nasib sel induk miogenik pada individu dewasa.^{6,22}

Selain meningkatkan sel-sel peradangan, kerusakan juga meningkatkan pelepasan faktor-faktor pertumbuhan yang terikat ke protein matriks ekstrasel, seperti proteoglikan sulfat. Proses ini melibatkan aktivitas matriks metaloproteinase (*matriks metalloproteinase*, MMP). Matriks metaloproteinase adalah suatu famili enzim proteolitik *zinc-dependent* yang bekerja di matriks ekstrasel, tempat enzim ini akan berkontribusi pada perkembangan, penggunaan, dan patologi berbagai jaringan. Matriks metaloproteinase, dan juga inhibitorynya yaitu inhibitor jaringan MMP (*tissue inhibitors of MMPs*, TIMP), terlibat dalam perkembangan, iskemi, mionekrosis, angiogenesis, denervasi, kerusakan akibat olah raga, atropi akibat tidak aktifnya otot, perbaikan dan regenerasi otot, serta miopati dan distropi peradangan pada otot rangka. Belum banyak yang diketahui mengenai MMP dan TIMP, tetapi berbagai penelitian menunjukkan bahwa MMP dan TIMP memiliki fungsi fisiologis yang penting dalam mempertahankan integritas dan homeostasis serat otot dan matriks ekstraselnya. Bedair dkk meneliti terapi eksogen MMP-1 pada otot gastrocnemius tikus ternyata membuat otot tersebut memiliki lebih banyak serat otot yang beregenerasi dan lebih sedikit jaringan ikatnya. Ini menunjukkan bahwa MMP-1 dapat meningkatkan regenerasi otot dengan meningkatkan jumlah serat otot dan mengurangi jumlah jaringan ikat.

Miogenesis melibatkan regulasi sejumlah proses, antara lain adhesi sel dan pengenalan antar sel. Proses-proses ini sangat penting untuk pengaturan dan fusi mioblas ke tabung otot. Pembentukan tabung otot yang berinti banyak ini penting sekali untuk perkembangan otot rangka. Berbagai penelitian telah meneliti proses proliferasi dan diferensiasi sel prekursor miogenik menjadi serat otot. Komponen molekular matriks ekstrasel juga berperan pada regulasi miogenesis. Akan tetapi, baru sedikit yang diketahui mengenai cara matriks ekstrasel otot berinteraksi dengan sel-serat otot yang berproliferasi dan berdiferensiasi sehingga mempengaruhi pembentukan dan pemeliharaan struktur otot rangka.

Akan tetapi, jika kerusakannya sangat berat sehingga membuat endomisium tidak utuh lagi, regenerasi serat otot tidak terjadi. Daerah yang rusak akan dimasuki oleh fibroblas yang menghasilkan kolagen, sehingga terjadi jaringan parut fibrosa. Kalau yang terjadi demikian, maka fungsi otot tergantung pada hipertrofi otot yang masih utuh.

2.1.3. Proses Penuaan pada Otot Rangka

Proses penuaan akan menyebabkan penurunan fungsi dan massa otot rangka (atrofi). Otot tetap harus digunakan dan pasti akan mengalami kerusakan yang memerlukan perbaikan. Sel punca, dalam hal ini sel satelit, berperan untuk mempertahankan jumlah dan fungsi serat otot, serta memperbaiki kerusakan. Namun seiring bertambahnya usia, kemampuan otot rangka yang rusak untuk memperbaiki diri akan menurun. Pada model aves dan mamalia, sel satelit yang secara dinamis berperan dalam perbaikan otot rangka sepanjang masa dewasa, pada proses penuaan akan menurun aktivitasnya. Proses penuaan akan meningkatkan kerentanan sel satelit terhadap apoptosis sehingga akan terjadi penurunan jumlah sel satelit. Akibatnya terjadi penurunan respons regenerasi bila terjadi kerusakan. Perubahan ini diduga disebabkan oleh perubahan pada lingkungan mikro (*niche*) yang akhirnya menghambat regulasi sel satelit. Proses penuaan juga mempengaruhi komposisi matriks ekstraselular di sekitar otot, termasuk berbagai molekul dan faktor-faktor pertumbuhan yang disekresinya, yang berpengaruh pada proses regenerasi otot rangka.

Populasi sel satelit pada otot rangka yang rusak dikendalikan oleh jalur sinyal Notch dan Numb, yang memegang peran kunci pada regenerasi otot terkait usia. Jalur-jalur ini berperan penting pada embriogenesis embrional. Proliferasi sel satelit sebagai respons terhadap kerusakan otot ditingkatkan oleh jalur Notch, sedangkan diferensiasi miogenik terminal dihambat oleh jalur Numb, yang berfungsi sebagai antagonis metabolik Notch. Selama terjadi kerusakan otot, ligan Notch yaitu Delta berikatan dengan reseptornya dan mengaktivasi transduksi sinyal Notch, yang kemudian akan menstimulasi aktivitas mitotik sel satelit. Proses penuaan akan menyebabkan Delta tersebut gagal mentransduksi sinyal ke reseptor Notch, akibatnya regenerasi tidak terjadi dengan baik. Penelitian transplantasi otot antara hewan muda dan tua memperlihatkan bahwa pemulihan otot tidak tergantung usia donor melainkan usia penerima. Jalur sinyal Notch dan aktivasi sel satelit pada otot dari hewan yang sudah tua kembali pulih ketika berada di lingkungan mikro hewan yang lebih muda.

Berkaitan dengan proses penuaan otot rangka, terdapat berbagai pendapat mengenai perbedaan jumlah dan diameter otot rangka antar usia. Ada yang berpendapat bahwa jumlah serat otot rangka akan berkurang seiring bertambahnya usia dari lahir sampai tua. Pendapat lain menyatakan bahwa penurunan jumlah serat baru terjadi sejak usia 60 tahun. Penelitian-penelitian pada berbagai hewan (tikus, anjing, babi dan sapi) menunjukkan adanya penurunan jumlah serat otot rangka dari usia muda ke dewasa. Di lain pihak ada juga yang justru tidak menemukan perubahan jumlah serat otot mencit usia satu hari sampai enam bulan. Rayne dan Crawford (1975) meneliti perkembangan otot pterigoideus tikus berbagai usia. Jumlah serat otot pada yang jantan bertambah dua kali lipat antara sejak lahir dengan enam minggu kemudian. Peningkatan ini kemudian diikuti oleh penurunan sampai lebih dari 10% antara usia enam minggu sampai tahap dewasa. Jumlah serat pterigoideus lateral meningkat sekitar 45% antara sejak lahir dengan dewasa.³⁶ Timson dan Dudenhoeffer (1980) meneliti 12 tikus dari usia 25 hari sampai 365 hari. Mereka berkesimpulan bahwa tidak terjadi perubahan, dalam hal ini penurunan jumlah serat serat.¹⁷ Beberapa penelitian mendapatkan bahwa pada proses penuaan akan terjadi atropi otot rangka, terutama

tipe II. Tetapi beberapa penelitian yang lain justru tidak menemukan adanya perbedaan diameter.¹⁷

2.1.4. Sel Punca pada Otot Rangka

Pada masa awal perkembangan embrional, sel-sel mesodermal somit berdiferensiasi menjadi sklerotom yang menjadi bakal otot, dan dermomiotope yang menjadi bakal kulit. Pada suatu eksperimen yang melabel sel dengan protein fluoresen hijau (*green fluorescent protein*, GFP) dan cangkok untuk mengikuti jalur sel-sel progenitor otot selama embriogenesis. Sel-sel ini bergerak dari daerah dermomiotope sentral dan berdiferensiasi menjadi sel-sel mesenkimal. Pada tahap awal perkembangan embrional ini belum dapat dideteksi penanda-penanda spesifik otot rangka. Setelah itu, sebagian besar sel-sel progenitor otot rangka mengekspresikan penanda Pax7 dan Pax3 (sel Pax3+/Pax7+). Gen Pax mengkodekan faktor-faktor transkripsi yang berperan penting pada perkembangan. Pax7 menandai sel satelit dan Pax3 menandai mioblas. Sel-sel Pax3+/Pax7+ dipertahankan sebagai populasi yang berproliferasi pada otot embrional dan janin, dan menjadi sel-sel progenitor otot embrio dan janin. Pada akhir masa janin, sel-sel Pax7+ menempati posisi sel satelit pada otot (Gambar 2.4), sedangkan mioblas (sel Pax3+) menjadi populasi tersendiri.^{6,22}

Gambar 2.4. Ekspresi Pax7 yang tinggi pada sel satelit (panah putih) dibandingkan pada inti serat otot (panah hitam)



Sumber: Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84:209-238

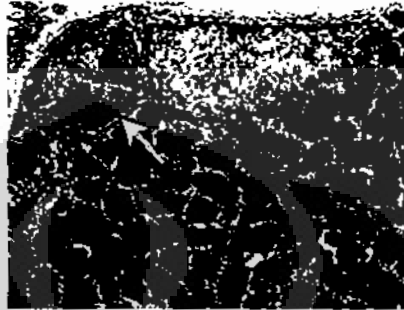
2.1.4.1. Sel Satelit^{1,6,22,37}

Pada proses perkembangan otot rangka, sejumlah besar mioblas berfusi dan berdiferensiasi menjadi serat otot. Sejumlah kecil mioblas yang terletak di antara lamina basalis dan sarkolema serat otot kemudian membentuk suatu kumpulan sel punca miogenik mononuklir, yang dikenal sebagai sel satelit. Sel satelit muncul pada tahap akhir miogenesis dan pertama kali terlihat pada tungkai embrio (Seale dkk, 2001). Setelah proses miogenesis selesai, sel satelit terus berproliferasi untuk mendukung pertumbuhan otot dengan menyumbangkan inti sel untuk memperbesar serat otot. Pada otot yang sudah dewasa dan tidak bertumbuh lagi, sel satelit tidak bermitosis lagi. Sel satelit miogenik berperan penting pada perkembangan pascalahir otot rangka dan juga regenerasi otot. Sel satelit bisa dipisahkan dari serat otot dan berkembang menjadi tabung otot dalam kultur. Kemampuan regeneratif sel satelit yang luar biasa menunjukkan bahwa sel-sel ini dapat terus memperbaharui diri dan pada saat yang sama menghasilkan sel-sel progeni. Dengan demikian sel satelit merupakan populasi sel punca otot rangka.

Sel satelit merupakan kelompok sel miogenik mononuklir yang belum terdiferensiasi. Jika dikultur secara *in vitro*, sel satelit akan menunjukkan karakteristik yang spesifik sehingga bisa dibedakan dengan mioblas mudigah dan janin. Sel satelit terutama diidentifikasi *in situ* dengan karakteristik morfologisnya. Dengan mikroskop elektron terlihat bahwa sel satelit terletak pada lamina basalis di sekitar serat otot individual, di antara membran plasma serat otot dengan membran basalis. Gambaran morfologis sel satelit lain yang penting adanya peningkatan rasio inti:sitoplasma, berkurangnya organel, dan ukuran inti yang lebih kecil dengan peningkatan jumlah heterokromatin, dibandingkan dengan inti serat otot (Gambar 2.5). Semua karakteristik ini menunjukkan bahwa sel satelit tidak aktif bermitosis dan kurang aktif bertranskripsi dibandingkan inti serat otot. Identifikasi sel satelit dengan mikroskop cahaya agak sulit, walaupun penggunaan penanda seperti laminin dan distrofin untuk mengidentifikasi lamina basalis dan sarkolema dapat membantu. Perkembangan teknik untuk mengisolasi dan mempelajari serat otot tunggal dengan sel satelit residennya secara *in vitro* sangat membantu pemahaman tentang populasi sel ini. Akan tetapi, identifikasi secara *in vivo* masih sulit sehingga

menyulitkan penelitian dan akhirnya regenerasi otot rangka sulit dipahami sepenuhnya. Untuk mengatasinya, para peneliti kemudian berfokus pada identifikasi penanda molekuler yang spesifik terhadap sel satelit (Tabel 2.2).

Gambar 2.5. Inti sel satelit (panah putih) dengan inti serat otot (panah hitam)



Sumber: Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84:209-238

Sel satelit terdapat pada seluruh jaringan otot rangka walaupun distribusinya tidak rata (Tabel 2.3). Contohnya, persentase sel satelit pada otot soleus yang termasuk tipe lambat adalah 2-3 kali lebih tinggi daripada otot tibialis anterior atau ekstensor digitorum longus yang termasuk tipe cepat. Jumlah sel satelit pada serat otot lambat lebih tinggi dibandingkan dengan pada serat otot cepat dalam otot yang sama. Walaupun perbedaan densitas sel satelit antara kedua jenis serat otot ini sangat nyata, mekanisme regulasi di balik fenomena ini masih belum dapat dipahami dengan baik. Peningkatan densitas sel satelit juga terdapat pada daerah taut neuromuskular dan daerah dekat kapiler, menunjukkan bahwa terdapat beberapa faktor pada struktur tersebut yang berperan dalam pemanggilan sel satelit ke lokasi tertentu atau dalam regulasi cadangan sel satelit. Regulasi densitas sel satelit pada masing-masing serat juga menunjukkan peran serat otot dalam regulasi pool sel satelit.

Populasi sel satelit juga bervariasi sesuai usia (Tabel 2.3). Bukti-bukti menunjukkan bahwa sejalan dengan bertambahnya usia terjadi penurunan densitas sel satelit. Otot rangka usia neonatus memiliki sel satelit yang lebih banyak dibandingkan otot rangka individu yang lebih tua. Otot hewan muda memiliki lebih dari 30% sel satelit, sedangkan pada otot hewan yang lebih tua didapatkan

sekitar 5% sel satelit. Selama pertumbuhan otot pasca kelahiran, terjadi penurunan yang dramatis pada proporsi inti sel satelit. Penurunan ini terutama disebabkan oleh peningkatan yang dramatis pada jumlah inti serat otot, mengikuti terjadinya fusi sel satelit. Pada beberapa otot, hal ini dikombinasi dengan penurunan keseluruhan jumlah sel satelit glikolitik.

Tabel 2.2. Penanda sel satelit

Molecular Markers	Satellite Cell Expression		Experimental Protocol
	Quiescent	Proliferating	
Cell surface			
M-cadherin (74, 150)	+/-	+	In vivo/in vitro
Syndecan-3 (73)	+	+	In vivo/in vitro
Syndecan-4 (73)	+	+	In vivo/in vitro
<i>c-met</i> (74)	+	+	In vivo/in vitro
VCAM-1 (153)	+	+	In vivo
NCAM (148)	+	+	In vivo
Glycoprotein Leu-19			
(148, 267)	+	+	In vivo/in vitro
CD34 (28)	+/-	+/-	In vitro
Cytoskeletal			
Desmin (42, 74)	-	+	In vivo/in vitro
Transcription factors			
Pax7 (275)	+	+	In vivo/in vitro
Myf5 (28, 74)	+/-	+	In vivo/in vitro
MyoD (74)	-	+	In vivo/in vitro
MNF (115)	+	+	In vivo/in vitro
MSTN (73, 168, 211)	+	-/+	In vitro/in vivo
IRF-2 (153)	+	+	In vivo
Msx1 (73)	+	-	In vitro

MSTN, myostatin; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; NCAM, neural cell adhesion molecule; MNF, myocyte nuclear factor; IRF-2, interferon regulatory factor-2. Reference numbers are given in parentheses.

Sumber: Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84:209-238

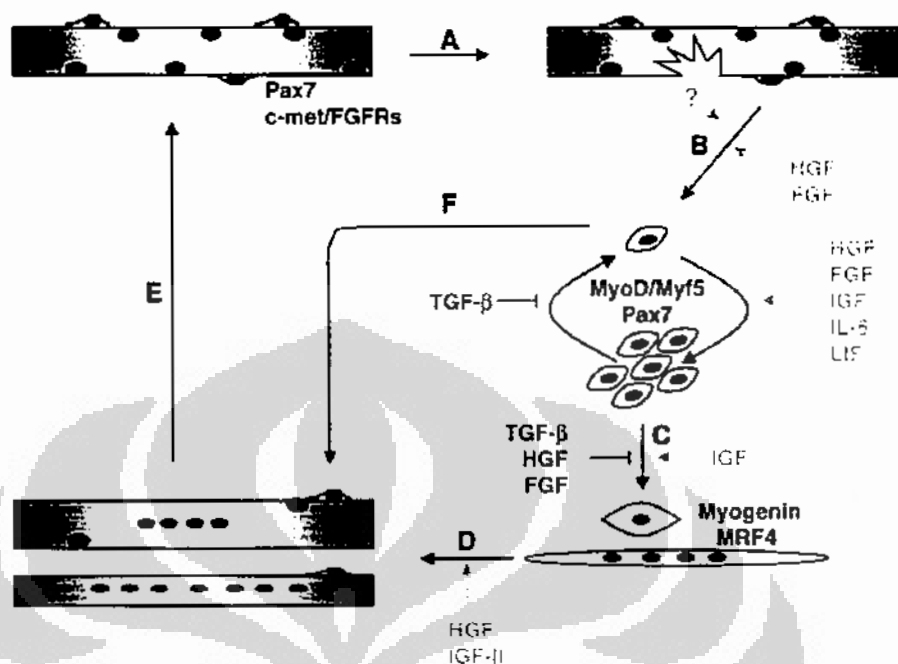
Tabel 2.3. Jumlah sel satelit di otot rangka berbagai usia dan tipe serat

Animal Model	Muscle	Age, mo	Satellite Cell Nuclei, %	Number of Desmin ⁺ Cells/Fiber	Fiber Yielding No Cell, %
Mouse cross-sections (291)	EDL	5-7	1.2		
	Soleus	5-7	4.1		
Rat cross-sections (118)	EDL	1	7		
		12	2.9		
		24	1.9		
	Soleus	1	9.6		
		12	6.6		
		24	4.7		
Rat cross-sections (265)	TA	2	4		
	Soleus	2	11		
Mouse single fiber explant (42)	EDL	0.5		116 ± 16	0
		1		91 ± 11	0
		1.5		64 ± 5	0
		3.5		18 ± 4	25
		18		10 ± 3	50
Mouse single fiber explant (61)	EDL	1.5-2		30 ± 6	1
		4		37 ± 5	0
		12-13		3 ± 1	50

(Sumber: Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84:209-238(216))

Sel satelit, seperti telah ditulis sebelumnya, menjadi aktif setelah terjadi kerusakan otot atau sebagai respons terhadap olah raga. Sel-sel ini akan masuk siklus sel dan berproliferasi untuk membangun serat otot dan membentuk sel satelit yang baru (Gambar 2.6). Penanda sel satelit membantu lokalisasi sel-sel itu di otot dan in vitro setelah isolasi. Sel-sel tersebut mengekspresikan faktor inti miosit (*myocyte nuclear factor*, MNF) dan reseptor tirosin kinase c-met (reseptor HGF). Penanda MyoD dan Myf5, yaitu suatu famili aktivator transkripsi faktor regulator miogenik (*myogenic regulatory factor*, MRF), ditemukan pada sel-sel yang berproliferasi dan teraktivasi, selain itu pada waktu yang sama ekspresi gen angiogenesis juga terlihat pada sel-sel endotel.

Gambar 2.6. Skema proses regulasi sel satelit pada regenerasi serat otot rangka

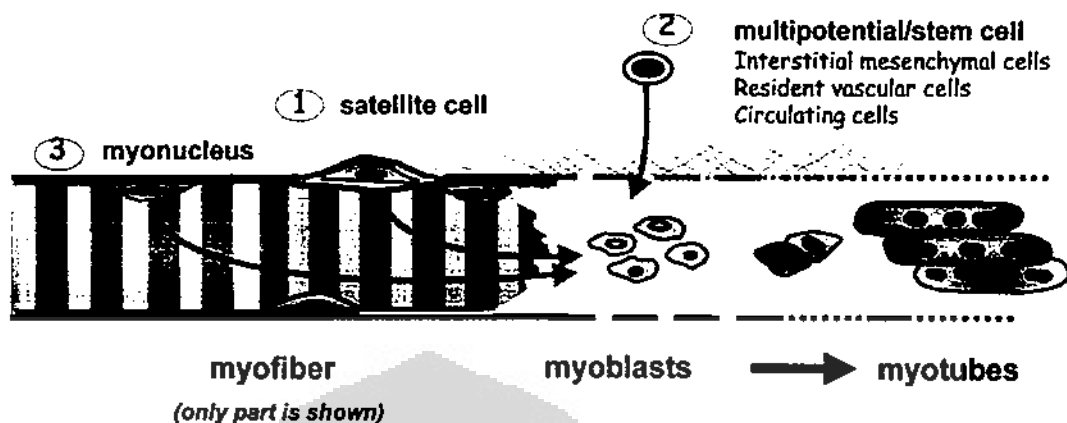


Sumber: Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84:209-238

2.1.4.2. Sel Punca Otot Rangka Lainnya^{1,6,22}

Selama ini sel satelit dianggap merupakan satu-satunya sumber inti sel pada perbaikan otot. Ternyata penelitian-penelitian terkini memperlihatkan adanya sel punca multipoten pada berbagai jaringan dewasa (Gambar 2.8). Sel-sel progenitor yang diisolasi dari sumsum tulang, jaringan otot rangka dewasa, kompartemen neuronal, dan berbagai jaringan mesenkimal dapat berdiferensiasi menjadi galur miogenik. Secara khusus, sel punca sumsum tulang dan otot rangka dewasa telah diperlihatkan mampu berdiferensiasi menjadi serat otot (in vitro) dan berkontribusi pada regenerasi otot (in vivo). Sinyal kemokin membuat sel-sel punca menjadi terkumpul di beberapa tempat, misalnya pada sumsum tulang, dan juga di otot rangka. Migrasi sel-sel progenitor otot merupakan suatu proses yang kompleks dan memerlukan sinyal-sinyal yang membuat sel-sel tersebut tetap motil dan menemukan target mereka.

Gambar 2.7. Kemungkinan sumber inti sel untuk regenerasi otot rangka.



Sumber: Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The Role of Stem Cells in Skeletal and Cardiac Muscle Repair. *J Histochem Cytochem*, 2002; 50(5): 589-610

- **Sel-sel sumsum tulang (bone marrow-derived cells, BMDC)**

BMDC berasal dari sel-sel *side population* (SP) sumsum tulang. SP merupakan suatu populasi sel-sel yang memiliki aktivitas sel punca, dan mampu merepopulasi keseluruhan galur hematopoietik. Penelitian-penelitian terkini mengimplikasikan bahwa sel-sel SP sumsum tulang berpotensi menjadi berbagai sistem organ, antara lain otot rangka. BMDC dapat bergerak dari pembuluh darah ke dalam otot rangka untuk mendukung perbaikan otot. Sekali BMDC bermigrasi ke otot rangka, sel-sel ini berpotensi untuk berfusi dengan serat otot dewasa dan sebagian kecil sel-selnya akan menempati posisi sel satelit. Hal ini menunjukkan bahwa BMDC dapat meningkatkan jumlah sel satelit dan membantu merepopulasi kompartemen ini setelah terjadi kerusakan otot. Beberapa sel progenitor dari sumsum tulang yang dapat turut berpartisipasi pada regenerasi otot yaitu prekursor mielomonositik c-kit+, sel-sel CD45-/Sca-, sel-sel CD45+/Sca+.

Sel punca yang berasal dari sumsum tulang telah dipertimbangkan menjadi kandidat terapi transplantasi untuk penyakit degeneratif otot. Namun walaupun beberapa kelompok penelitian melaporkan hasil yang menjanjikan, hal kontribusi BMDC menjadi otot rangka harus ditelaah lagi. Frekuensi kontribusi sel-sel ini dilaporkan sangat rendah, 0,01-0,1% pada otot yang beristirahat. Kontribusi ini meningkat pada kondisi kerusakan otot, menunjukkan bahwa kerusakan berperan penting dalam pemanggilan sel-sel ke otot. Akan tetapi peningkatan ini juga

hanya menjadi 5% dari total serat otot, paling tinggi yang dilaporkan adalah 12% dari total serat otot. Masih harus dilakukan banyak penelitian untuk menemukan kondisi selular dan lingkungan yang optimum demi meningkatkan pengambilan dan konversi miogenik sel punca tersebut untuk keperluan terapi.

- *Sel punca otot dewasa (CD45:Sca1)*

Selain BMDC, ditemukan juga sel progenitor miogenik non sel satelit yang ditemukan pada otot rangka, suatu populasi sel punca dewasa, yaitu *muscle side population* (mSP). Sel punca dewasa ini akan berkomitmen pada diferensiasi miogenik secara *in vivo* dan *in vitro* jika dikokultur dengan mioblas.

Sel-sel ini sepertinya lebih dapat berkontribusi secara bermakna terhadap regenerasi otot setelah terjadinya kerusakan otot. Sel-sel tersebut mengekspresikan penanda hematopoietik CD45 dan Sca1. Namun bukti-bukti menunjukkan populasi sel ini berasal dari otot dan bukan berasal dari sirkulasi.

Walaupun mekanisme komitmen sel punca pada galur miogenik ini belum diketahui, dapat dipastikan bahwa lingkungan mikro berperan penting dalam penentuan takdir sel punca. Sel-sel CD45+:Sca1+ yang diisolasi dari otot yang sedang beristirahat tidak mengekspresikan penanda miogenik apapun. Tetapi jika sel-sel tersebut diisolasi dari sel-sel yang sedang beregenerasi akan mengekspresikan penanda miogenik. Hal ini menunjukkan bahwa lingkungan mikro sangat penting untuk menginisiasi komitmen miogenik dari sel-sel punca otot dewasa yang belum terdiferensiasi ini. Karena sudah merupakan konsep umum bahwa proses regenerasi otot pascalahir adalah seperti proses miogenesis embrional, kemungkinan besar faktor-faktor yang terlibat dalam induksi miogenesis embrional juga terlibat dalam mengarahkan sel punca dewasa ke galur miogenik, antara lain protein famili Wnt dan Pax7.

Belakangan, ada bukti yang dikemukakan yang menyanggah pernyataan bahwa sel punca otot dewasa CD45+ merupakan populasi sel yang stabil dan berasal dari otot rangka. Rosu-Myles dkk mentransplantasikan sumsum tulang GFP+ dan menemukan bahwa 8 minggu setelah transplantasi hampir semua sel CD45+ di otot rangka adalah GFP+. Hal ini menunjukkan bahwa populasi CD45+ di otot rangka seluruhnya berasal dari sumsum tulang. Selain itu, sel-sel

CD45+ yang berasal dari sumsum tulang juga didapatkan bermigrasi ke HGF pada *assay* migrasi *transwell*. HGF adalah ligan yang berikatan dengan c-met (reseptornya) lalu mengaktifkan sel satelit, dan juga secara fungsional berkaitan dengan pemanggilan sel-sel CD45+ yang berasal dari sumsum tulang ke otot. Hal ini menunjukkan bahwa HGF dapat merupakan ligan yang umum untuk semua progenitor miogenik.

- ***Progenitor miogenik Pax3+***

Pax3 telah diidentifikasi sebagai suatu faktor transkripsi yang penting pada tahap awal miogenesis embrional. Selama perkembangan janin, populasi sel-sel Pax3+:Pax7+ diperlukan untuk pembentukan otot rangka pada embrio. Dulu Pax3 dianggap tidak berperan pada miogenesis dewasa. Namun belakangan terbukti bahwa mungkin terdapat suatu populasi miogenik yang langka, yang berbeda dengan sel satelit, mengekspresikan Pax3, yang berada di interstisium. Kultur sel dari otot tungkai dan diafragma mencit Pax7^{-/-} mengekspresikan Pax3 dan MyoD, sedangkan kebanyakan sel MyoD⁺ tidak mengekspresikan Pax3 pada mencit tipe liar. Selain itu sel-sel Pax3+ diidentifikasi di ruang interstisial. Namun Pax3 tidak dideteksi di kompartemen sel satelit, menunjukkan bahwa Pax3 adalah penanda suatu populasi progenitor miogenik yang baru.

- ***Sel darah tali pusat manusia (human umbilical cord blood, HUCB)***

Darah tali pusat manusia mengandung banyak sel punca. Sel-sel HUCB dapat berdiferensiasi miogenik *in vitro*. Sel-sel HUCB yang ditanamkan langsung ke otot yang rusak pada mencit SCID juga terlibat dalam regenerasi otot.

2.1.4.3. Lingkungan Mikro Sel Punca Otot Rangka^{1,6,7,22,37}

Matriks ekstrasel terdiri glikoprotein, kolagen, dan proteoglikan. Proteoglikan mempengaruhi proses miogenik melalui regulasi fibrilogenesis kolagen, modulasi pertumbuhan sel, dan respons terhadap faktor-faktor pertumbuhan. Komposisi matriks ekstrasel jaringan otot diduga dikontrol oleh beban mekanik yang diterima oleh sel-sel dalam jaringan ikat. Defisiensi salah satu atau beberapa komponen matriks ekstrasel dapat mengakibatkan kelainan

pertumbuhan atau disfungsi otot. Selain MRF, komponen makromolekular matriks ekstrasel juga berperan pada regulasi miogenesis. Tetapi baru sedikit yang diketahui mengenai cara matriks ekstrasel otot berinteraksi dengan sel-serat otot yang berproliferasi dan berdiferensiasi sehingga mempengaruhi pembentukan dan pemeliharaan struktur otot rangka. Matriks ekstrasel membentuk suatu arsitektur dinamis yang kompleks yang mengkomunikasikan informasi ke sel melalui reseptor integrin. Regulasi ekspresi temporal dan spasial integrin mioblas sangat penting pada pembentukan tabung otot. Beban mekanik merangsang sel-sel jaringan ikat dan matriks ekstrasel melalui reseptor integrin dan sitoskeleton yang menghubungkan matriks ekstrasel dengan sel. Interaksi antara sel dan matriks ekstrasel tidak hanya mengontrol bentuk dan orientasi sel, tetapi juga secara langsung meregulasi fungsi seluler, antara lain migrasi, diferensiasi, proliferasi, dan ekspresi berbagai gen. Interaksi tersebut juga berperan penting pada kondisi patologis, antara lain regenerasi dan progresi tumor.

Proses pertumbuhan dan regenerasi otot rangka dipengaruhi oleh berbagai faktor pertumbuhan dan serangkaian peristiwa seluler, yang meregulasi sel satelit. Respons regenerasi sel satelit yang sudah tua dan inaktif terhadap faktor-faktor pertumbuhan berbeda dengan yang masih muda dan aktif berproliferasi. Faktor-faktor potensial yang dapat meregulasi sel satelit antara lain olah raga, trauma, regangan pasif, persarafan, dan faktor-faktor pertumbuhan. Beberapa faktor pertumbuhan yang telah diteliti perannya dalam regulasi proliferasi, diferensiasi, dan motilitas sel satelit antara lain *insulin-like growth factors* 1 dan 2 (IGF-1 dan IGF-2), faktor pertumbuhan hepatosit (*hepatocyte growth factor*, HGF), faktor pertumbuhan fibroblast (*fibroblast growth factors*, FGF), *transforming growth factors* ($TGF-\beta$), sitokin-sitokin interleukin-6 (*leukemia inhibitory factor*, LIF dan interleukin-6, IL-6), faktor pertumbuhan dari platelet (*platelet-derived growth factor*, PDGF), faktor pertumbuhan epidermal (*epidermal growth factors*, EGF), makrofag, ekstrak otot/ platelet yang rusak (*crushed muscle/platelet-derived extract*), dan tenasin-C.^{8,9} Selain itu sel satelit diregulasi oleh faktor regulator miogenik, seperti MyoD, Myf5, miogenin, dan MRF4. Faktor transkripsi famili MEF2 juga dapat meningkatkan diferensiasi miogenik.

2.2. Tenasin-C

Tenasin-C (TNC) adalah suatu glikoprotein heksabrakion anggota famili glikoprotein tenasin, bersama tenasin-R, tenasin-W, tenasin-X, dan tenasin-Y.⁸ Nama lain TNC antara lain adalah protein matriks ekstrasel glial/mesenkimal (*glial/mesenchymal extracellular matrix protein*, GMEM)³⁹, antigen miotendinous⁴⁰, heksabrakion⁴¹, sitotaktin (*cytotactin*)⁴², J1220/200⁴³, tenasin⁴⁴, and neuronektin⁴⁵.

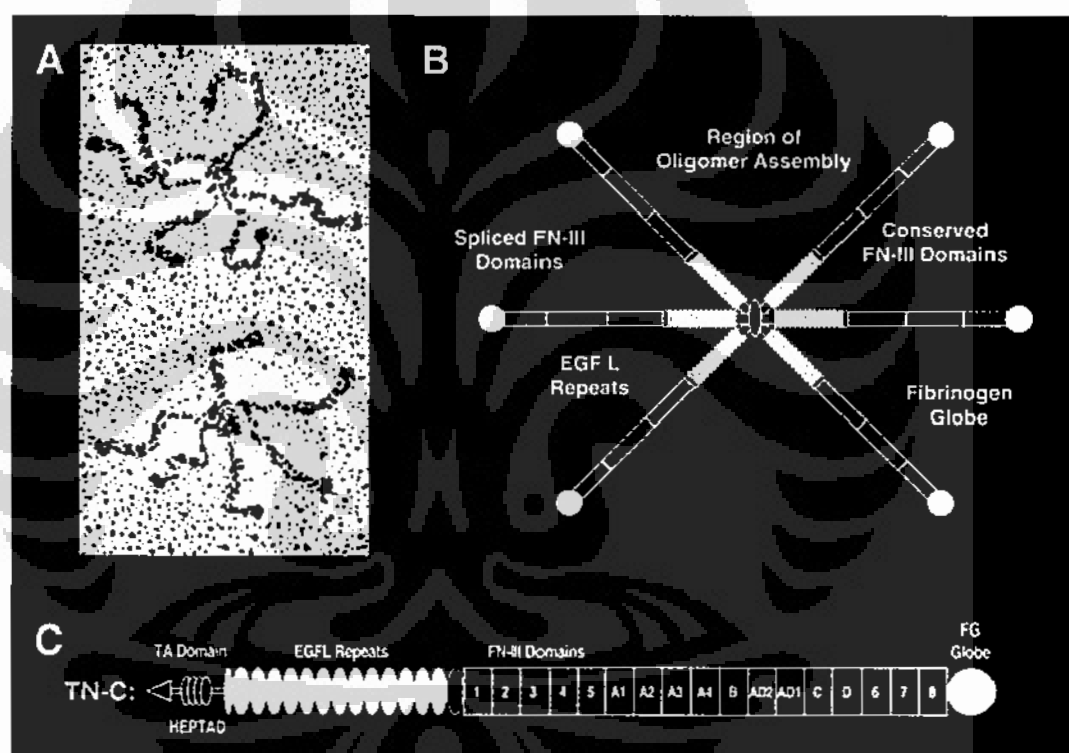
TNC berbentuk heksabrakion berikatan disulfida dengan subunit-subunit berberat molekul antara 120 dan 300 kDa tergantung ekspresi isoform dan spesiesnya.⁸⁻¹¹ (Gambar 2.9) Tiap subunit disusun oleh TA (*tenascin assembly domain*), 14_1/2 *epidermal growth factor (EGF)-like repeats*, repetisi fibronektin tipe III (*FN III-like repeats*) dengan jumlah yang bervariasi, dan domain yang terkait fibrinogen (*Fbg-related domain*) pada terminal C.³⁵ Gen yang mengkode TNC terletak pada kromosom manusia 9; 9q33.³⁶

Ukuran monomer TNC bervariasi sebagai hasil *splicing* alternatif di daerah repetisi FN III pada tingkat pre-mRNA. Terdapat delapan repetisi FN III yang dipertahankan (*conserved*), disimbolkan dengan nomor 1-8. Pada manusia terdapat sembilan *splice* alternatif di repetisi FN III disimbolkan dengan huruf A-D, disisipkan antara repetisi yang dipertahankan no. 5 dan 6. Pada orang dewasa, varian terkecil TNC membuang domain yang di-*splice* alternatif dan ini terdapat di jaringan statis, sementara varian besar mengandung domain FN III yang di-*splice* alternatif dalam kombinasi yang bervariasi dan ditemukan pada jaringan yang berkembang, keadaan patologis, remodeling jaringan, dan juga regenerasi, inflamasi dan tumorigenesis.³⁴

TNC merupakan tenasin yang terdistribusi paling luas dan hanya terlihat pada lokasi interaksi epitel-mesenkim di jaringan dewasa. Berbeda dengan protein matriks ekstrasel lainnya, tenasin memperlihatkan pola ekspresi yang sangat terbatas dan dinamis pada embrio, terutama pada perkembangan saraf, skeletogenesis, dan vaskulogenesis. TNC diekspresikan dalam pola terbatas secara regional pada otak, tulang rawan, dan mesenkim. Ekspresi TNC pada berbagai jaringan bervariasi, tergantung tingkat perkembangan organismenya. TNC berperan pada remodeling jaringan selama masa perkembangan embrional.

Pada orang dewasa, TNC terdapat pada tendon dan perbatasan otot-tendon (*myotendinous antigen*) di perikondrium dan periosteum, juga di jaringan otot polos. Ekspresi TNC ditemukan juga di pembuluh darah baru (*neovasculature*) dan stroma tumor yang tidak berdiferensiasi. Molekul-molekul ini diekspresikan kembali semasa dewasa pada proses-proses normal seperti penyembuhan luka, regenerasi saraf, dan involusi jaringan, serta pada proses-proses patologis seperti penyakit vaskular, tumorigenesis, dan metastasis.

Gambar 2.8. Struktur Tenasin-C



Sumber: Jones FS, Jones PL. The Tenascin Family of ECM Glycoproteins: Structure, Function, and Regulation During Embryonic Development and Tissue Remodeling. *Dev Dyn* 2000; 218:235-59

Pada kanker payudara, ekspresi TNC berkorelasi dengan peningkatan penyebaran dan dianggap merupakan suatu faktor prognosis untuk metastase. Ekspresi TNC yang tinggi pada cedera akut telah diketahui, dan ini mungkin memainkan peranan penting untuk memastikan proses peradangan dan perbaikan pada daerah kerusakan. Perubahannya dramatis pada berbagai kondisi patologis,

seperti tumor, degenerasi tendon, sinovitis, kolitis, adenoma kolon dan kanker kolorektal, kondisi patologis sumsum tulang, dan pneumonia interstisial. Peningkatan ekspresi TNC terlihat pada proses perbaikan aktif, seperti pada penyembuhan luka, penyakit peradangan paru, dan keloid. Ekspresi TNC juga berkorelasi dengan migrasi sel di embrio dan migrasi sel glioma. Data-data juga menunjukkan bahwa TNC merupakan substrat permissif untuk migrasi sel mikrovaskuler, dan antibodi anti-TNC menghambat *sprouting* sel endotel in vitro.

TNC terlibat dalam berbagai fungsi seluler, seperti peningkatan pertumbuhan, hemaglutinasi, imunosupresi sel-T, peningkatan angiogenesis dan kondrogenesis. Walaupun menciit TNC^{-/-} tidak menunjukkan kelainan fenotip yang berarti, famili protein tenasin diyakini berperan penting pada beberapa proses seluler, antara lain adhesi, migrasi, dan proliferasi, yang penting untuk angiogenesis.

Penelitian terhadap kerja spesifik TNC pada berbagai jenis sel, seringkali menunjukkan efek kontradiktif. TNC meningkatkan perlekatan sel-sel endotel vena umbilikalis manusia (HUVEC) dan fibroblas in vitro, tapi sebaliknya bersifat anti perlekatan untuk oligodendrosit dan sel-sel krista neuralis. TNC meningkatkan migrasi HUVEC dan sel-sel endotel retina sapi, tapi menghambat migrasi sel-sel glioma dan oligodendrosit. In vivo, TNC sering ditemukan sebagai komponen lingkungan migrasi sel-sel motil seperti sel-sel progenitor hematopoetik dan sel-sel neuron di embrio, tapi dapat mewakili zona restriksi yang tak dapat dilewati sel misalnya di separuh anterior somit. TNC dapat menstimulasi proliferasi, tetapi juga pernah dilaporkan mengenai efek penghambatan pertumbuhan.

TNC dapat melakukan fungsi seluler yang berbeda berkat interaksinya dengan berbagai protein matriks ekstrasel dan reseptor permukaan sel, antara lain anggota famili integrin. Selain itu juga tergantung pada presentasi (terlarut atau terikat substrat), jenis sel, dan status diferensiasi jaringan target. Ekspresi tenasin diregulasi berbagai faktor pertumbuhan, sitokin, peptida vasoaktif, protein matriks ekstrasel, dan faktor biomekanik. Sinyal-sinyal yang dikeluarkan oleh faktor-faktor ini berikatan pada kombinasi elemen regulator-*cis* tertentu pada promotor gen tenasin melalui aktivator atau represor transkripsional tertentu. Kompleksitas

lainnya pada regulasi ekspresi gen tenasin adalah pada *splicing* alternatif, yang menghasilkan varian-varian polipeptida tenasin yang menunjukkan kombinasi fungsional domain protein yang berbeda.

Diduga TNC dihasilkan oleh fibroblas, terutama bila terjadi peningkatan jumlah dan aktivitas fibroblas.¹¹ Selain itu TNC juga diketahui disekresi oleh antara lain miofibroblas pada kanker kolon manusia³⁰, astrosit²⁴, megakariosit²⁵, keratinosit epidermal manusia²⁷, dan sel endotel pembuluh mikro otak manusia (*human brain microvessel endothelial cells*, HBMEC)²⁸.

2.2.1. Peran Tenasin-C dalam Regenerasi Otot Rangka

2.2.1.1. Peran Tenasin-C dalam Miogenesis^{8,13,21,33}

Gangguan protein sitoskeleton dan integritas seluler serat otot memicu serat otot melepaskan faktor-faktor pertumbuhan tertentu. Aktivasi sel satelit secara normal dikaitkan dengan kerusakan serat otot dan gangguan sarkolema. Studi in vitro dan eksperimen pada manusia menunjukkan aktivasi sel satelit sebagai respons terhadap latihan jangka panjang, dibuktikan dengan pewarnaan positif molekul adhesi sel saraf (*neural cell adhesion molecule*, N-CAM). Aktivasi sel satelit disertai peningkatan intensitas pewarnaan propeptida N-terminal prokolagen tipe I (*procollagen type I N-terminal propeptide*, PINP) dan TNC. PINP mengindikasikan sintesis kolagen tipe I dalam matriks ekstrasel, TNC dikontrol oleh beban tarikan dan diregulasi pada tingkat transkripsi melalui daerah *stretch-responsive cis-acting* pada gen promotor dan memperkuat adhesi lateral serat otot ke endomisium di sekitarnya. Pemberian beban berat pada otot akan mempengaruhi matriks ekstrasel, bisa dengan menginduksi robekan mikro (*microtear*), mengirimkan isyarat ke fibroblas yang ada untuk melepaskan faktor-faktor pertumbuhan yang akan mengaktifkan sel satelit, atau menginisiasi pelepasan faktor-faktor pertumbuhan dari serat otot.

TNC diduga berfungsi menstimulasi proliferasi sel, kemungkinan sel satelit, dan juga membantu proses regenerasi otot. Efek anti-perlekatan TNC akan melepaskan perlekatan fokal sel dan dengan sitoskeletonnya sehingga memperkuat efektivitas faktor-faktor pertumbuhan dan juga membantu migrasi sel. TNC memblok adhesi sel ke fibronektin dengan cara memblok fungsi ko-reseptor

syndecan-4 pada pemberian sinyal integrin melalui pengikatan kompetitif TNC ke situs ikatan *syndecan-4* pada fibronektin. Ini akan membebaskan sel dari ikatannya ke fibronektin. Beberapa penelitian melaporkan bahwa TNC menstimulasi MMP-1 (kolagenase) pada berbagai jaringan.

Pengiriman sinyal Wnt dan MAPK diinduksi oleh TNC. Pengiriman sinyal Wnt telah terbukti penting pada pembentukan otot selama embriogenesis dan juga telah terbukti berperan penting pada diferensiasi miogenik dan nasib sel induk miogenik pada individu dewasa. Otot soleus tikus dengan defisiensi TNC ternyata akan mengalami atrofi progresif. Hal ini menegaskan kemungkinan pendekatan sistemik *in vivo* dan menggambarkan efek protektif TNC dalam mencegah sarkopenia.

Ekspresi anti-perlekatan protein TNC juga diyakini diperlukan untuk perbaikan sel yang mengalami beban mekanik. Sifat anti-perlekatan akan membebaskan dari ketegangan. Flück dkk mengamati bahwa faktor kendali RNA tergantung TNC terlibat dalam anti-perlekatan, miogenesis, dan penyembuhan luka setelah beban mekanik. Pengamatan ini mengindikasikan bahwa anti-perlekatan terjadi pada otot rangka. Kendali TNC termodulasi pada regulator utama proliferasi sel dan diferensiasi serat otot, yaitu mioG dan siklinA, memberikan wawasan penting. Jangka waktu peningkatan yang dipengaruhi TNC mencerminkan pengambilan sel yang lambat setelah kerusakan miokard pada mencit berdefisiensi TNC. Ini mengindikasikan bahwa produksi TNC yang diinduksi kerusakan mengatur laju perbaikan serat otot dengan memodulasi aktivasi sel interstisial dan miogenik. Siklus kerusakan mikro dan perbaikannya dapat berkontribusi ke pergantian otot basal otot rangka. Observasi peneliti mengimplikasikan peran peningkatan TNC yang diregulasi beban pada siklus kerusakan-perbaikan ini. Hal ini mengindikasikan bahwa peningkatan kerentanan otot terhadap kerusakan mekanik pada mencit dengan defisiensi TNC dan atrofi serat otot tipe cepat selama masa hidup mencit. Yang menarik adalah serat otot tipe cepat memperlihatkan kelemahan pilihan terhadap kerusakan akibat pembebanan pada hewan pengerat dan pewarnaan TNC ektopik dengan atrofi dan sarkopenia pada manusia. Semua ini mengacu pada kemungkinan bahwa penurunan ekspresi TNC menjadi kofaktor etiologi sarkopenia pada manusia.

2.2.1.2. Peran Tenasin-C Pada Angiogenesis^{10,28}

TNC meningkatkan adhesi, penyebaran, dan migrasi sel endotel, yang penting untuk angiogenesis. Bukti-bukti yang mendukung pernyataan tersebut antara lain bahwa ekspresi TNC secara spasial dan temporal meningkat pada berbagai kondisi yang berkaitan dengan angiogenesis, seperti pada pembuluh darah jaringan granulasi yang baru terbentuk pada proses penyembuhan luka, tetapi tidak terdeteksi atau menurun secara bermakna pada jaringan parut yang sudah sembuh. TNC juga diekspresikan pada angiogenesis yang berkaitan dengan artritis dan penyakit neoplastik. Contohnya pada glioma manusia, akumulasi TNC dan deteksi mRNA TNC berkorelasi dengan derajat neovaskularisasi tumor.

Bukti berikutnya TNC terikat ke heparin, suatu modulator angiogenesis yang penting. Selain itu sel endotel melekat pada TNC, sebagian melalui $\alpha_2\beta_1$ dan $\alpha v\beta_3$, keduanya terlibat dalam angiogenesis. $\alpha v\beta_3$ penting untuk angiogenesis yang terinduksi FGF dan meningkat ekspresinya pada pembuluh darah angiogenik glioblastoma multiformis. Kemudian tenasin-X, salah satu anggota famili tenasin, berinteraksi dengan faktor pertumbuhan endotel vaskular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), suatu faktor angiogenik yang poten, untuk meningkatkan proliferasi sel endotel.

2.2.1.3. Peran Tenasin-C Pada Reinervasi^{8,9}

Cifuentes dkk meneliti keterlibatan TNC dalam reinervasi otot rangka. Observasi mereka menyiratkan bahwa TNC berperan dalam formasi, maturasi, dan stabilisasi taut neuromuskular.⁹

TNC diekspresikan dalam kadar tinggi oleh sel prekursor glial pada saraf perifer embrio ayam yang sedang berkembang; sintesis mRNA-nya mencapai puncak pada periode waktu ketika pertumbuhan aksonal maksimal. TNC sebagai substrat *in vitro* memediasi pertumbuhan neurit, baik neuron motorik maupun sensorik. Kemampuan pada TNC untuk menumbuhkan neurit diregulasi oleh status perkembangan: saraf sensoris embrio ayam umur 4 hari (tahap mulainya perkembangan saraf perifer) tumbuh dengan segera dan cepat. Sedangkan neuron dari embrio yang lebih tua merespons setelah beberapa lama. Domain TNC yang bertanggung jawab terhadap aktivitas ini terletak di dalam bagian terminal C

(distal) subunit TNC. Reseptor integrin sepertinya terlibat pada neurit perifer karena pertumbuhan mereka pada TNC sepenuhnya dihambat oleh antibodi terhadap integrin $\beta 1$. Kontras terhadap proses neuronal, sel satelit saraf dapat menempel ke substrat TNC tetapi sepenuhnya dihambat aktivasi migrasinya. Substrat artifisial yang membatasi antara tenasin dan fibronektin atau laminin bertindak sebagai penghalang selektif yang membiarkan neurit lewat dan menahan sel satelit.

2.3. Tikus Sprague-Dawley³⁴

Tikus galur Sprague-Dawley adalah salah satu dari tiga kelompok utama tikus laboratorium tikus albino yang sering digunakan sebagai subyek penelitian medis. Tikus galur ini termasuk dalam spesies *Rattus norvegicus* dan awalnya dibiakkan dari galur Wistar. Kelebihan tikus ini adalah perilakunya yang tenang dan mudah untuk ditangani. Selain itu tikus ini juga mudah dibiakkan dan dengan demikian mudah untuk mendapatkan tikus-tikus dengan usia dan jenis kelamin yang diinginkan. (Tabel 2.4) Tikus galur Sprague-Dawley sudah sering digunakan sebagai model muskuloskeletal dalam berbagai penelitian.

Tabel 2.4. Data biologis tikus galur Sprague-Dawley

Parameter	Ukuran
Berat badan dewasa: jantan	300 – 800 gram
Berat badan dewasa: betina	250 – 400 gram
Masa hidup	2 – 3,5 tahun
Kebutuhan makanan	10 gram / 100 gram/hari
Kebutuhan air	10 – 12 ml / 100 gram/hari
Mulai masa subur: jantan/betina	65 – 110 hari
Masa kehamilan	21 – 23 hari

Sumber: <http://www.ratbehavior.org>

Jenis kelamin ditentukan sama, yaitu jantan, untuk menyamakan kondisi hormonal subyek penelitian, karena hormon (estrogen/testosteron) merupakan

salah satu faktor yang mempengaruhi perkembangan otot. Akan tetapi faktor-faktor lainnya tidak dapat dikendalikan dalam penelitian ini.

Kelompok usia tikus ditentukan berdasarkan tahap-tahap perkembangan penting dalam rentang hidup tikus. (Tabel 2.5) Penentuan usia 1 hari (neonatus) adalah untuk melihat kondisi pada saat laju pertumbuhan dan perkembangan sangat pesat, serta pada saat ini regenerasi diketahui berlangsung sangat baik. Usia 3 bulan dipilih karena sudah masuk masa puber sehingga sudah ada pengaruh hormon tapi tidak terlalu jauh dengan usia 1 hari dan 12 bulan. Usia ini dibandingkan dengan usia manusia kira-kira 15 tahun, perkembangan masih cukup pesat, kapasitas regenerasi masih baik. Usia 12 bulan dipilih dengan membandingkan dengan usia manusia kira-kira 30 tahun, yaitu sudah mencapai masa akhir perkembangan, semua organ bisa dikatakan sudah matur, kemampuan regenerasi mulai menurun.

Tabel 2.5. Perbandingan usia tikus dengan usia manusia

Usia tikus (bulan)	Usia tikus (tahun)	Usia tikus dibandingkan dengan usia manusia
1,5 bulan (pubertas)	0,125 tahun	12,5 tahun (pubertas)
6 bulan (kematangan sosial)	0,5 tahun	18 tahun (kematangan sosial)
12 bulan	1 tahun	30 tahun
18 bulan	1,5 tahun	45 tahun
24 bulan	2 tahun	60 tahun
30 bulan	2,5 tahun	75 tahun
36 bulan	3 tahun	90 tahun
42 bulan	3,5 tahun	105 tahun
45 bulan	3,75 tahun	113 tahun
48 bulan	4 tahun	120 tahun

Sumber: <http://www.ratbehavior.org>

2.4. Prinsip Dasar Pewarnaan Imunohistokimia^{31,38}

Imunohistokimia adalah suatu metode untuk melokalisasi suatu antigen tertentu pada jaringan dengan memanfaatkan interaksi antigen-antibodi. Antibodi yang digunakan diberi label, berfungsi sebagai reagen spesifik yang akan berinteraksi dengan antigen yang dicari, kemudian divisualisasikan dengan suatu penanda seperti pewarna fluoresens, enzim, elemen radioaktif, atau emas koloid.

Imunohistokimia memanfaatkan reaksi spesifik antigen-antibodi, sehingga memiliki kelebihan dibandingkan teknik pewarnaan enzim khusus yang telah lama digunakan, yang hanya dapat mengidentifikasi sejumlah kecil protein, enzim, dan struktur jaringan. Karenanya, imunohistokimia telah menjadi teknik penting dan digunakan secara luas di laboratorium penelitian medis dan diagnostik klinis. Terdapat banyak sekali metode imunohistokimia yang dapat digunakan untuk melokalisasi antigen. Pemilihan metode yang paling cocok harus berdasarkan parameter-parameter seperti jenis spesimen yang diteliti dan derajat sensitivitas yang diperlukan.

Ada dua metode deteksi antigen pada jaringan:

- **Metode langsung**

Metode langsung adalah metode pewarnaan satu-langkah, menggunakan antibodi yang telah dilabel, yang akan berikatan secara langsung dengan antigen yang dicari. Karena hanya menggunakan satu antibodi maka prosedur ini sederhana dan cepat. Tetapi masalah sensitivitas dapat timbul karena amplifikasi sinyal yang kecil. Metode ini kurang sering digunakan dibandingkan dengan metode tidak langsung.

- **Metode tidak-langsung**

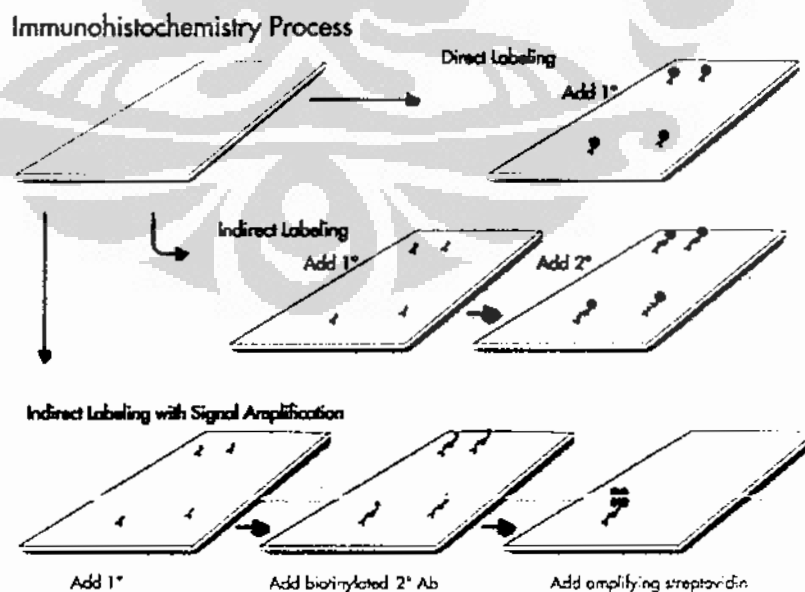
Metode tidak-langsung melibatkan antibodi primer yang tidak dilabel yang akan berikatan dengan antigen jaringan, kemudian antibodi sekunder yang dilabel yang akan berikatan dengan antibodi primer. Antibodi sekunder ini harus dibuat cocok dengan IgG spesies hewan untuk memproduksi antibodi primer. Metode ini lebih sensitif karena amplifikasi sinyal melalui beberapa reaksi antibodi sekunder dengan berbagai situs antigenik antibodi primer. Metode tidak langsung juga mempunyai kelebihan yaitu hanya memerlukan sedikit antibodi sekunder sehingga lebih ekonomis.

Antibodi sekunder dapat dilabel dengan pewarna fluoresen seperti FITC, rodamin, atau Texas red. Ini disebut metode imunofluoresens tidak-langsung.

Antibodi sekunder juga bisa dilabel dengan enzim, seperti peroksidase, fosfatase alkalin, atau oksidase glukosa. Metode ini disebut metode imunoenzim tidak-langsung.

Metode ABC adalah metode imunohistokimia standar dan merupakan salah satu yang paling banyak digunakan. Avidin adalah suatu glikoprotein besar, dapat dilabel dengan peroksidase atau fluoresen, dan mempunyai afinitas yang tinggi terhadap biotin. Biotin adalah suatu vitamin berberat molekul rendah, dapat dikonjugasikan ke berbagai molekul biologis, seperti antibodi. Teknik ini melibatkan tiga lapisan. Lapisan pertama adalah antibodi primer yang tidak dilabel. Lapisan kedua adalah antibodi sekunder yang terbiotinilasi. Lapisan ketiga adalah avidin-peroksidase yang akan membentuk kompleks dengan biotin dari lapisan kedua. Peroksidase kemudian direaksikan dengan 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) untuk menghasilkan warna coklat. Jika antibodi primer dan sekunder dipasangkan, kemudian ditambahkan DAB, maka ini disebut pewarnaan DAB.

Gambar 2.10. Proses Imunohistokimia



Sumber: <http://millipore.com>

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian perbandingan potong lintang (*comparative cross sectional*) dengan membandingkan parameter yang diukur antara ketiga kelompok usia hewan percobaan. Perlakuan pada penelitian ini adalah pada perbedaan usia ketiga kelompok hewan coba, yaitu 1 hari, 3 bulan, dan 12 bulan. Penelitian sejenis terhadap ketiga kelompok umur tersebut belum pernah dilakukan.

3.2. Tempat penelitian

Semua hewan coba dikandangan dalam Animal House FKUI. Pengambilan organ dari hewan coba, pembuatan sediaan, pewarnaan HE dan optimalisasi pewarnaan imunohistokimia TNC dilakukan di Laboratorium Departemen Histologi FKUI. Mikrofotografi, pemindaian dan penggunaan piranti lunak Digimizer dilakukan di ruang komputer dan mikrofotografi Departemen Histologi FKUI. Pengerjaan imunohistokimia hingga selesai dan dokumentasi hasilnya dilakukan di Departemen Histologi FKUI. Penelitian ini dilakukan selama 10 bulan, dalam dua tahap, yaitu tahap pertama dari tanggal 7 Desember 2007 sampai tanggal 6 Juni 2008, lalu dilanjutkan lagi tahap kedua dari tanggal 9 Februari 2009 sampai tanggal 5 Juni 2009.

3.3. Hewan coba

Subyek penelitian adalah tikus putih jantan galur Sprague-Dawley. Penentuan jumlah subyek menggunakan rumus Federer, yaitu:

$$(t-1)(n-1) \geq 15; t = \text{jumlah perlakuan}, n = \text{besar sampel}$$

Penelitian ini memiliki tiga kelompok usia hewan coba, sehingga $t = 3$.

Maka:

$$(3-1)(n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 7,5$$

$$n \geq 8,5 \approx 9 \tag{3.1}$$

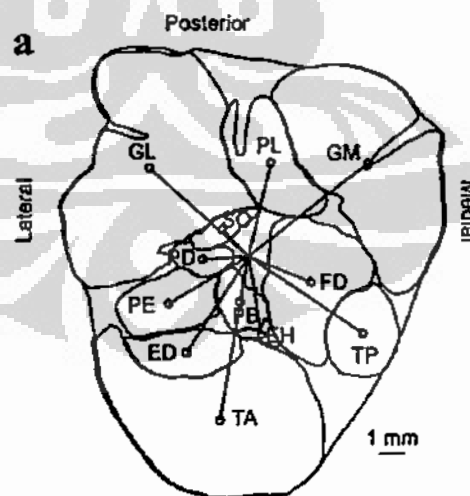
Jadi jumlah subyek penelitian tiap kelompok usia adalah 9 ekor tikus. Total jumlah subyek adalah $9 \times 3 = 27$ ekor tikus.

Subyek penelitian diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Puslitbang Biomedis dan Farmasi DepKes RI. Protokol penelitian sudah disetujui oleh Litbang Depkes RI.

Tiga kelompok usia yang ditentukan adalah 1 hari, 3 bulan, dan 12 bulan. Tetapi karena keterbatasan waktu dan jumlah tikus yang tersedia, maka usia 1 hari menjadi 1-4 hari (rata-rata 1 hari), usia 3 bulan menjadi 3-4 bulan (rata-rata 4 bulan), dan usia 12 bulan menjadi 12-16 bulan (rata-rata 14 bulan).

Permasalahan berikutnya adalah ketika harus mengambil otot gastroknemius dan otot soleus dari tungkai belakang tikus usia 1-4 hari, karena masih sangat halus sehingga sulit dibedakan. Karena itu keseluruhan tungkai belakang diambil dan diproses sampai menjadi blok (posisi tungkai diatur sedemikian rupa sehingga diperkirakan akan mendapatkan potongan melintang terbaik yang mengenai kedua otot yang diinginkan. Setelah dilakukan pewarnaan, identifikasi kedua otot dilakukan berdasarkan posisinya terhadap kulit, tulang tibia dan fibula dan orientasi dengan otot-otot lainnya.¹⁶

Gambar 3.1. Skema anatomis tungkai belakang tikus



(Sumber: Wang LC, Kernell D. Quantification of fibre type regionalisation: an analysis of lower hindlimb muscles in the rat. *J. Anat.* 2001; 198:295-308.301)

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat:

1. Fasilitas kandang hewan di Animal House
2. Set diseksi mikroanatomi
3. Pinset jaringan
4. Ruang sungkup eter
5. Meja operasi hewan percobaan
6. Kapas
7. Kain kasa
8. Jarum pentul
9. Pompa syringe untuk fiksasi intravital
10. Wadah untuk fiksasi jaringan kulit
11. Pembakar Bunsen
12. Batang besi bentuk L untuk blok paraffin
13. Mikrotom
14. Kaca obyek
15. Kaca penutup
16. Mikroskop cahaya
17. Mikrometer
18. Kamera digital merk Kodak (EasyShare V1003)
19. Komputer dan Scanner
20. Piranti lunak Digimizer version 3.6.1.0
21. Piranti lunak SPSS Statistics 17.0

3.4.2. Bahan:

1. Es serut
2. Ketamine (Ketalar®)
3. Eter
4. Larutan formol salin
5. Larutan NaCl 0,9%
6. Alkohol: 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%
7. Xylol

8. Benzyl benzoate
9. Lilin paraffin
10. Balsam kanada atau Entellan
11. Hematoksilin Harris
12. Eosin
13. Antibodi tenasin-C (goat anti mouse)
14. ABC Staining System (goat)
15. Larutan dapar fosfat salin, pH 7,4
16. Larutan dapar asam sitrat, pH 6,0
17. HCl / H₃PO₄ (untuk penyesuaian pH larutan dapar)
18. NaOH (untuk penyesuaian pH larutan dapar)
19. H₂O₂
20. Methanol
21. Air destilasi
22. Hematoksilin Mayer

3.5. Protokol Penelitian

3.5.1. Prosedur Pengambilan Otot Gastroknemius dan Otot Soleus

Tikus kelompok usia 1-4 hari dianestesi dengan metode hipotermi, tikus kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan dianestesi dengan injeksi intraperitoneal ketamine dosis 75 mg/kg BB. Setelah tikus tertidur, diletakkan di meja untuk operasi hewan percobaan. Kemudian dilakukan torakotomi dengan insisi kulit, jaringan otot di garis tengah dada dan pemotongan tulang rawan iga (di sendi kostosternal). Setelah rongga dada terbuka, diidentifikasi ventrikel kiri jantung dan diinsersikan jarum dari pompa *syringe* untuk fiksasi intravital. Cairan fiksatif mengalir dari gelas beker ke mesin pompa menuju jarum yang telah difiksasi di ventrikel kiri jantung. Proses ini berlangsung hingga 30 menit, sampai seluruh tubuh tikus, termasuk ekor dan kuduk menjadi kaku, serta terlihat fasikulasi otot-otot. Kemudian otot gastroknemius dan otot soleus dipisahkan secara in toto, termasuk tendonnya, dari jaringan sekitarnya. Kedua berkas otot dipotong pada bagian medialnya (bagian paling besar) setebal \pm 1 cm, lalu diletakkan dalam

wadah berisi cairan dapar formalin. Didiamkan dalam suhu ruangan selama 24 jam.

3.5.2. Proses Pembuatan Sediaan

Dehidrasi bertahap dengan menggunakan alkohol dengan konsentrasi yang makin meningkat. Pembeningan di dalam benzyl benzoat I, II dan campuran benzol-parafin. Pembenaman (*embedding*) di dalam parafin cair. Pengecoran (*blocking*): potongan jaringan diletakkan dalam kubus dari dua besi Leuckhart, dituangkan parafin cair ke dalam kubus tersebut. Pemotongan (*sectioning*): Blok dipotong dengan mikrotom. Perekatan ke kaca obyek (*mounting*): Di dalam penangas air, dengan sengkelit pita parafin direkatkan ke kaca obyek. Proses pembuatan sediaan membutuhkan waktu 2-3 minggu.

3.5.3. Pewarnaan Hematoksilin-Eosin

Deparafinisasi dalam xylol. Hidrasi dalam larutan alkohol dengan gradasi yang menurun dari 100% - 95% - 90% - 80% - 70%. Inkubasi dalam larutan hematoksilin Harris selama 15 menit. Bilas dalam air mengalir, celup dalam campuran asam-alkohol secara cepat 3-10 celup. Bilas dalam air mengalir, celup sebanyak 3-5 kali dalam larutan ammonium atau lithium karbonat. Cuci dalam air mengalir selama 10-20 menit. Inkubasi dalam eosin (15 detik - 2 menit). Dehidrasi dalam alkohol dengan konsentrasi yang meningkat secara perlahan, masing-masing selama 2 menit. Inkubasi dalam xylol 2x2 menit. Tutup dengan kaca penutup.

3.5.4. Pewarnaan Imunohistokimia³²

Setelah jaringan dipotong dengan ketebalan 4 µm diletakkan di atas kaca obyek yang telah dilapisi *silane*. Setelah proses deparafinisasi dan rehidrasi bertahap, sediaan diinkubasi dengan 0,5 % H₂O₂ dalam metanol selama 30 menit untuk menghentikan aktivitas peroksidase endogen, setelah itu dicuci dengan air destilasi secara mengalir selama 5 menit. Untuk memulihkan epitop (*antigen retrieval*), sediaan diinkubasi dalam dapar asam sitrat (pH 6,0) dan dipanaskan dalam oven gelombang mikro dalam empat tahap, pertama: pada tingkat kekuatan

9 selama 3 menit, kedua: pada tingkat kekuatan 6 selama 3 menit, ketiga: pada tingkat kekuatan 3 selama 5 menit, dan keempat: pada tingkat kekuatan 1 selama 10 menit. Setelah sediaan didinginkan dalam suhu ruangan (kira-kira 1 jam), kemudian sediaan dicuci dengan PBS 2 x 5 menit. Setelah itu diberi *blocking serum* (*donkey serum*, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) dan diinkubasi dalam kotak lembab pada suhu ruangan selama 30 menit. Kemudian *blocking serum* dibuang dan sediaan diinkubasi dengan antibodi primer yaitu anti tenasin-C (N-19/sc-9871, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), lalu diinkubasi semalaman dalam kotak lembab pada suhu 4°C. Keesokan harinya, setelah dicuci dengan PBS 3 x 5 menit, sediaan diinkubasi dengan antibodi sekunder (*biotinylated secondary antibody*, kit *ABC Staining System*, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) selama 30 menit dalam kotak lembab. Setelah dicuci dengan PBS 3 x 5 menit, sediaan diinkubasi dengan reagen enzim AB (*avidin and biotinylated horseradish peroxidase*, kit *ABC Staining System*, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) selama 30 menit dalam kotak lembab. Kemudian TNC divisualisasikan melalui substrat kromogen DAB, dengan cara inkubasi dalam DAB (substrat peroksidase, dari kit *ABC Staining System*, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) dalam kotak lembab selama 5 menit pada suhu kamar. Setelah itu sediaan dicuci dengan air destilasi secara mengalir selama 5 menit. *Counterstain* dilakukan dengan mencelupkan sediaan selama 1-2 detik ke dalam Hematoksilin Mayer. Kemudian sediaan dicuci dengan air destilasi secara mengalir selama 5 menit. Lalu sediaan didehidrasi dalam alkohol bertingkat dan dibeningkan menggunakan xylol, dan akhirnya ditutup dengan Entellan dan kaca penutup.

Kontrol positif dan negatif disertakan setiap kali pulasan. Kontrol positif yang dipakai adalah potongan jaringan otak tikus.¹⁵ Kontrol negatif adalah potongan jaringan yang tidak melalui tahapan inkubasi dengan antibodi primer.

3.6. Pengumpulan Data

Proses pengumpulan data dikerjakan dalam dua tahap: pertama untuk pewarnaan HE, dan kedua untuk pewarnaan imunohistokimia. Seluruh tahap dilakukan di Ruang Komputer Departemen Histologi FKUI.

Pada tahap pertama, diambil tiga buah sediaan otot terbaik dari tiap subyek (otot gastroknemius dan otot soleus), yaitu bagian median panjang otot, paramedian kiri dan paramedian kanan. Sediaan otot tikus kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan dipindai dengan pemindai Canoscan N640P, hasil disimpan dalam format JPEG. Sediaan otot tikus kelompok usia 1-4 hari langsung dibuat foto mikro otot gastroknemius dan otot soleus langsung dilakukan tanpa pemindaian, setelah sebelumnya ditentukan terlebih dahulu posisi kedua otot tersebut. Dari masing-masing sediaan diambil 5 lapangan pandang besar (10x40) yang dipilih secara acak, lalu dibuat foto mikro dengan kamera digital Kodak EasyShare V1003 dalam format JPEG. Mikrometer okuler sudah terpasang di lensa okuler, sehingga pada foto akan terlihat dan bisa dijadikan panduan pengukuran. Setelah itu dengan piranti lunak Digimizer Image Analyzer (versi 3.6.1.0, Belgium) dilakukan penilaian:

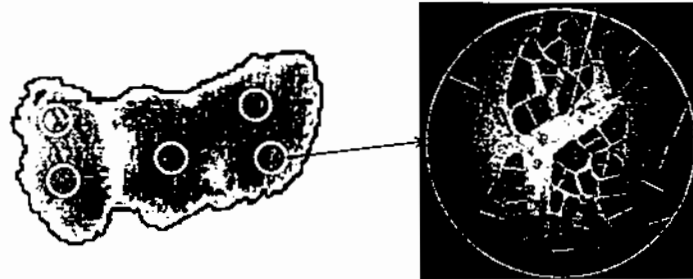
- **Jumlah serat otot rangka.**

Hasil pemindaian sediaan otot tikus kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan dianalisa luas masing-masing penampang ototnya (satuan mm²). Foto mikro sediaan otot tikus kelompok usia 1-4 hari diperiksa dan diukur luas penampang otot gastroknemius dan soleusnya dengan Digimizer. Kemudian masih dengan Digimizer, ditentukan area penghitungan dengan panduan mikrometer, lalu dihitung seluruh jumlah serat yang ada dalam area tersebut dengan sistem tagging. Dihitung rata-ratanya dari kelima lapangan pandang. Penghitungan jumlah serat otot dilakukan dengan membagi luas penampang otot dengan luas area pemandu, dikali jumlah rata-rata serat. Hasil berupa data numerik.

- **Diameter serat otot rangka.**

Diukur diameter terpendek dari lima buah serat otot rangka, dengan panduan mikrometer. Serat otot dipilih secara acak dari tiap sediaan, posisi kiri atas, kanan atas, tengah, kiri bawah, kanan bawah. Hasil pengukuran diambil nilai rata-ratanya. Hasil berupa data numerik.

Gambar 3.2. Metode penghitungan jumlah dan diameter serat

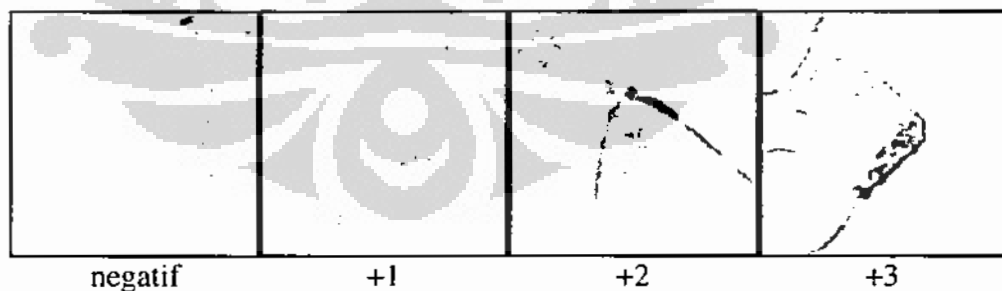


Pada pengumpulan data tahap kedua, diambil 3 lapangan pandang besar dari tiap sediaan otot (gastroknemius dan soleus) yang telah terwarnai secara imunohistokimia TNC. Dari masing-masing sediaan diambil 5 buah foto dari lapangan pandang besar (10x40) secara acak dengan kamera digital Kodak EasyShare V1003 dalam format JPEG. Penghitungan dilakukan secara manual. Penilaian ekspresi TNC sebagai berikut :

- **Intensitas pewarnaan imunohistokimia TNC.**

Dihitung masing-masing 100 serat otot dari otot gastroknemius dan soleus pada tiap kelompok. Berdasarkan skoring intensitas pewarnaan IHC World Scoring; 1 = *weak staining*/lemah, 2 = *moderate staining*/sedang, 3 = *strong staining*/kuat, 0 = negatif. Data yang diperoleh adalah data numerik yakni jumlah serat otot rangka dengan skor intensitas 0, 1, 2, atau 3.

Gambar 3.3. Ekspresi negative (0), lemah (+1), sedang (+2), dan kuat (+3)

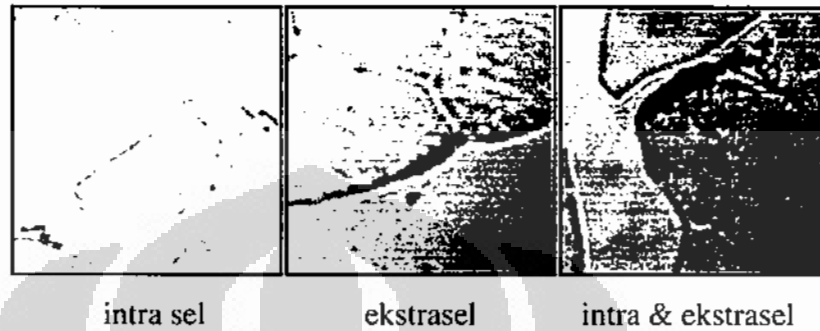


- **Pola ekspresi TNC**

Dicari 100 sel yang menunjukkan ekspresi positif terhadap TNC, lalu dikelompokkan menjadi positif intra sel, positif ekstra sel, atau positif kombinasi (intra dan ekstra sel). Data yang diperoleh berupa data numerik

yakni jumlah serat otot rangka yang positif intra sel, ekstra sel, atau kombinasi (intra sel dan ekstra sel).

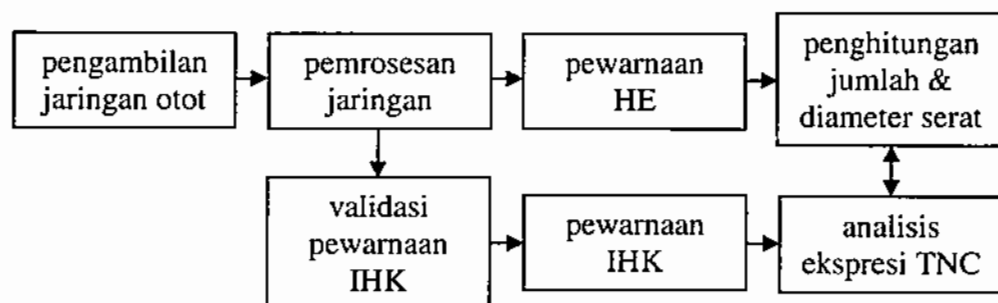
Gambar 3.4. Pola ekspresi Tenascin-C



3.7. Analisa Data

Data yang dikumpulkan berupa data-data numerik. Semua data diolah dengan program SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL). Data-data tersebut diuji normalitas sebarannya dengan uji Kolmogorov-Smirnov, dan homogenitas variansnya dengan uji Levene. Bila sebarannya tidak normal atau datanya tidak homogen, maka digunakan uji non parametrik (Kruskal-Wallis). Bila data normal dan homogen, untuk memeriksa data antara kelompok usia memiliki perbedaan bermakna atau tidak dilakukan uji Anova One-Way. Perbandingan data antar kelompok usia dianalisis dengan uji LSD. Hubungan antara ekspresi TNC dengan jumlah dan diameter serat otot rangka menggunakan uji korelasi bivariat Pearson. Perbedaan secara statistik dianggap bermakna bila interval kepercayaan (CI/ Confidence Interval) $< 0,05$.

3.8. Alur Penelitian



BAB 4

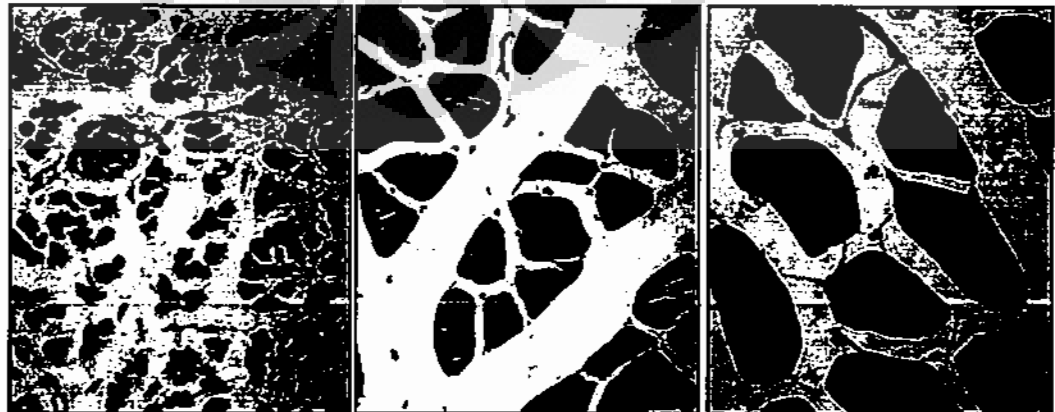
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Gambaran Histologi Otot Rangka Ketiga Kelompok Usia

Gambaran histologi otot gastroknemius dan soleus tikus kelompok usia 1-4 hari memperlihatkan sel-serat otot yang berukuran kecil, inti terletak di tepi, rasio inti dan sitoplasma lebih kecil dibandingkan serat otot tikus kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan. Masih bisa dijumpai sel mesenkim.

Gambaran histologi otot tikus kelompok usia 3-4 bulan serupa dengan gambaran otot rangka tikus kelompok usia 12-16 bulan. Pada kedua kelompok umur tersebut jelas terlihat peningkatan ukuran serat otot rangka, terutama dibandingkan dengan tikus kelompok usia 1-4 hari. Inti terletak di tepi, rasio inti dan sitoplasma lebih besar dibandingkan serat otot tikus kelompok usia 1-4 hari. Perbedaan antara otot tikus kelompok usia 3-4 bulan dengan tikus kelompok usia 12-16 bulan adalah pada jumlah dan diameter sel per lapangan pandang. Ruang antar serat otot rangka pada seluruh gambaran histologi tidak memperlihatkan adanya matriks ekstra sel yang masih utuh. Inti sel fibroblas dan sel darah dapat terlihat di ruang ekstra sel namun tidak terlihat substansi dasar dan serat-serat sebagai komponen matriks ekstra sel. Hal ini disebabkan hilangnya komponen matriks ekstrasel saat proses pembuatan sediaan.

Gambar 4.1. Perbandingan gambaran histologis potongan melintang otot rangka tikus Sprague-Dawley pada ketiga kelompok usia (HE, 400x)



Warna sitoplasma pada kelompok usia 1-4 hari terlihat lebih basofilik dibandingkan dengan kelompok usia lainnya. Hal ini mengindikasikan bahwa serat otot pada kelompok ini adalah serat yang baru terbentuk.

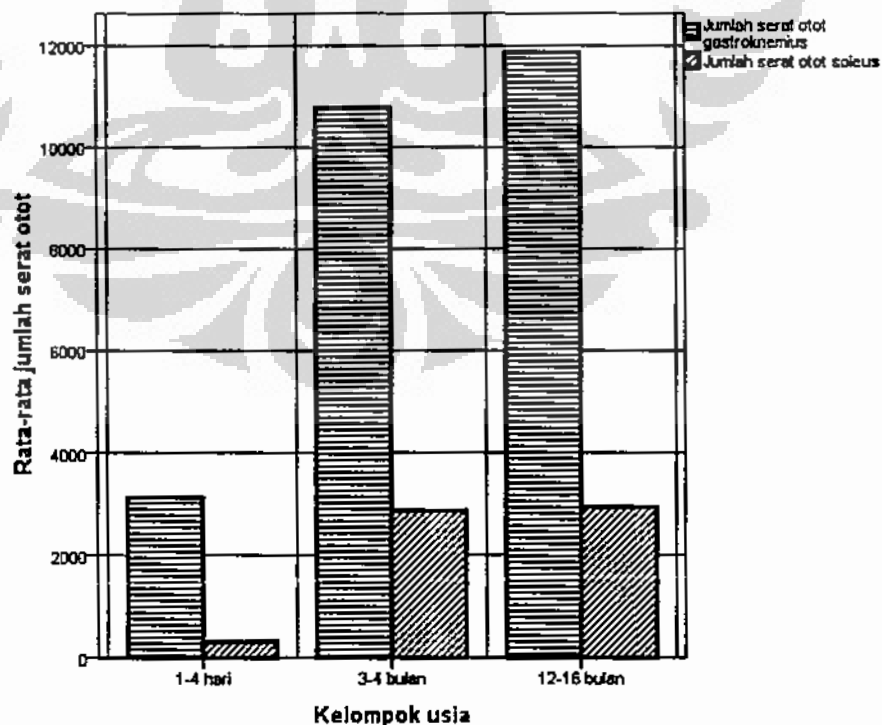
4.2. Perbedaan Jumlah Serat Otot Rangka Ketiga Kelompok Usia

Jumlah serat otot rangka yang dihitung dalam tiap sediaan paling sedikit di kelompok usia 1-4 hari, meningkat di kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan. (Tabel 4.1, Grafik 4.1)

Tabel 4.1. Jumlah serat otot rangka ketiga kelompok usia

Kelompok usia	Gastroknemius	Soleus
1-4 Hari	3127±68	307±15
3-4 Bulan	10766±380	2866±281
12-16 Bulan	11867±387	2936±162

Grafik 4.1. Perbandingan jumlah serat otot gastroknemius dan soleus ketiga kelompok usia



Uji normalitas data (*One-Sample Kolmogorov-Smirnov*) menunjukkan data jumlah serat otot gastroknemius dan soleus pada ketiga kelompok usia terdistribusi normal. Uji homogenitas data menunjukkan bahwa data pada ketiga kelompok usia tidak homogen, sehingga dilakukan uji Kruskal-Wallis. Uji statistik menurut Kruskal-Wallis menunjukkan derajat kebebasan = 2, dan tingkat kebermaknaan adalah $p = 0,001$. Analisis perbandingan dengan LSD menunjukkan perbedaan antar kelompok satu dengan yang lain. Jumlah serat otot gastroknemius antar kelompok usia berbeda bermakna. Tetapi jumlah serat otot soleus antara kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan tidak menunjukkan perbedaan bermakna.

Perbandingan jumlah serat otot yang terjadi dari kelompok usia 1-4 hari sampai kelompok usia 12-16 bulan menunjukkan terjadinya penambahan serat otot (hiperplasi), baik pada otot gastroknemius maupun soleus. Namun uji statistik menunjukkan jumlah serat otot soleus antara kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan tidak menunjukkan perbedaan bermakna. Hasil ini mengesankan jumlah serat otot soleus tidak mengalami peningkatan jumlah yang berarti dari usia 3-4 bulan sampai 12-16 bulan. Dengan demikian mengindikasikan bahwa penambahan massa otot soleus pada rentang usia tersebut lebih disebabkan oleh hipertrofi daripada hiperplasi.

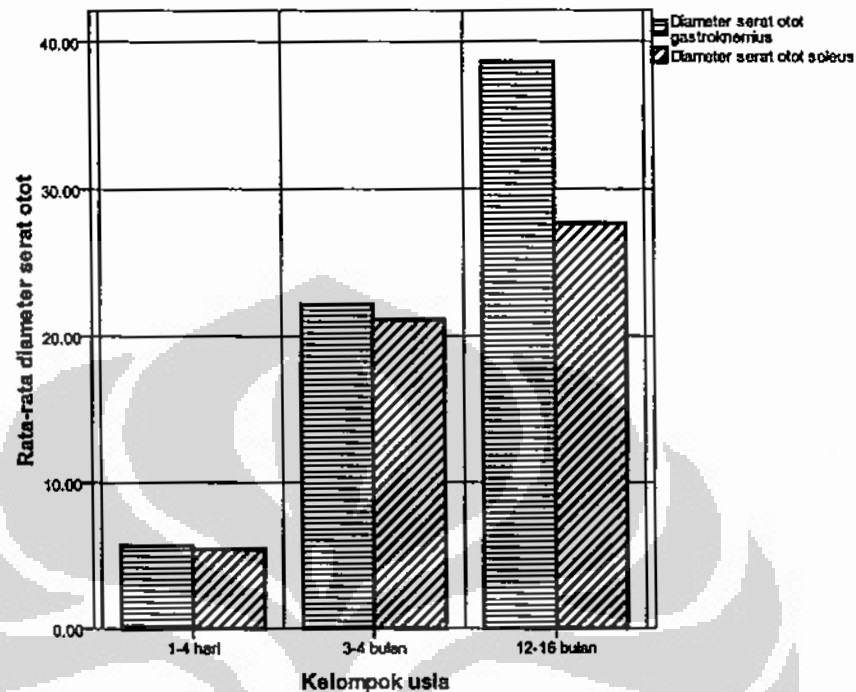
4.3. Perbedaan Diameter Serat Otot Rangka antara Ketiga Kelompok Usia

Diameter serat otot rangka di kelompok usia 1-4 hari merupakan yang terkecil, bertambah besar di kelompok usia 3-4 bulan dan terbesar di kelompok usia 12-16 bulan. (Tabel 4.2, Grafik 4.2)

Tabel 4.2. Diameter serat otot rangka ketiga kelompok usia

Kelompok usia	Gastroknemius	Soleus
1-4 Hari	5,64 $\mu\text{m} \pm 0,12$	5,42 $\mu\text{m} \pm 0,9$
3-4 Bulan	22,14 $\mu\text{m} \pm 1,31$	21,11 $\mu\text{m} \pm 1,21$
12-16 Bulan	38,61 $\mu\text{m} \pm 1,16$	27,67 $\mu\text{m} \pm 0,89$

Grafik 4.2. Perbandingan diameter serat otot gastroknemius dan soleus ketiga kelompok usia

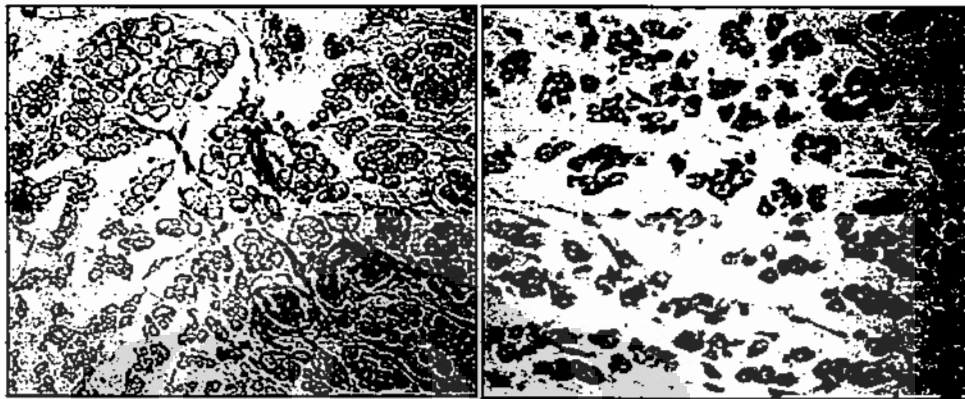


Perubahan diameter serat otot rangka menggambarkan proses hipertrofi serat otot rangka. Serat otot rangka tikus kelompok usia 1-4 hari masih imatur. Serat otot rangka tikus kelompok usia 3-4 bulan berada pada masa pertumbuhan dan perkembangan, diameter seratnya lebih besar dari serat otot rangka tikus kelompok usia 1-4 hari, tetapi lebih kecil dari serat otot rangka tikus kelompok usia 12-16 bulan. Serat otot rangka tikus kelompok usia 12-16 bulan sudah mengalami maturasi lengkap, diameternya paling besar di antara ketiga kelompok usia.

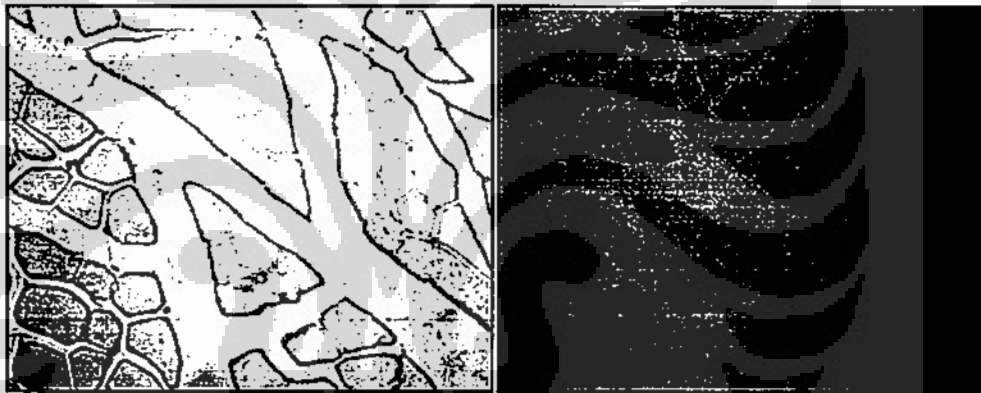
Uji normalitas data menunjukkan data diameter serat otot gastroknemius dan soleus pada ketiga kelompok usia terdistribusi normal. Uji homogenitas data menunjukkan bahwa data pada ketiga kelompok usia tidak homogen, sehingga dilakukan uji Kruskal-Wallis. Uji statistik menurut Kruskal-Wallis menunjukkan derajat kebebasan = 2, dan tingkat kebermaknaan adalah $p = 0,001$. Analisis perbandingan dengan LSD menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok usia satu dengan yang lain. Semuanya menunjukkan perbedaan yang bermakna.

4.4. Ekspresi Tenasin-C pada Otot Rangka Ketiga Kelompok Usia

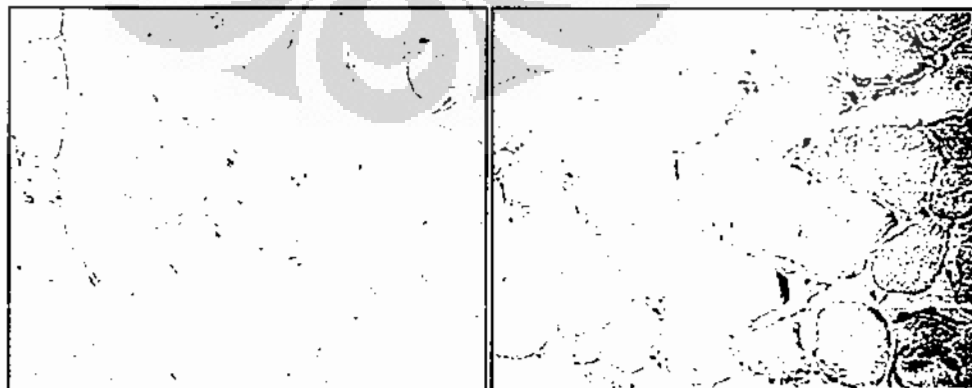
Gambar 4.2. Kontrol negatif dan hasil pewarnaan imunohistokimia TNC otot rangka tikus kelompok usia 1-4 hari



Gambar 4.3. Kontrol negatif dan hasil pewarnaan imunohistokimia TNC otot rangka tikus kelompok usia 3-4 bulan



Gambar 4.4. Kontrol negatif dan hasil pewarnaan imunohistokimia TNC otot rangka tikus kelompok usia 12-16 bulan

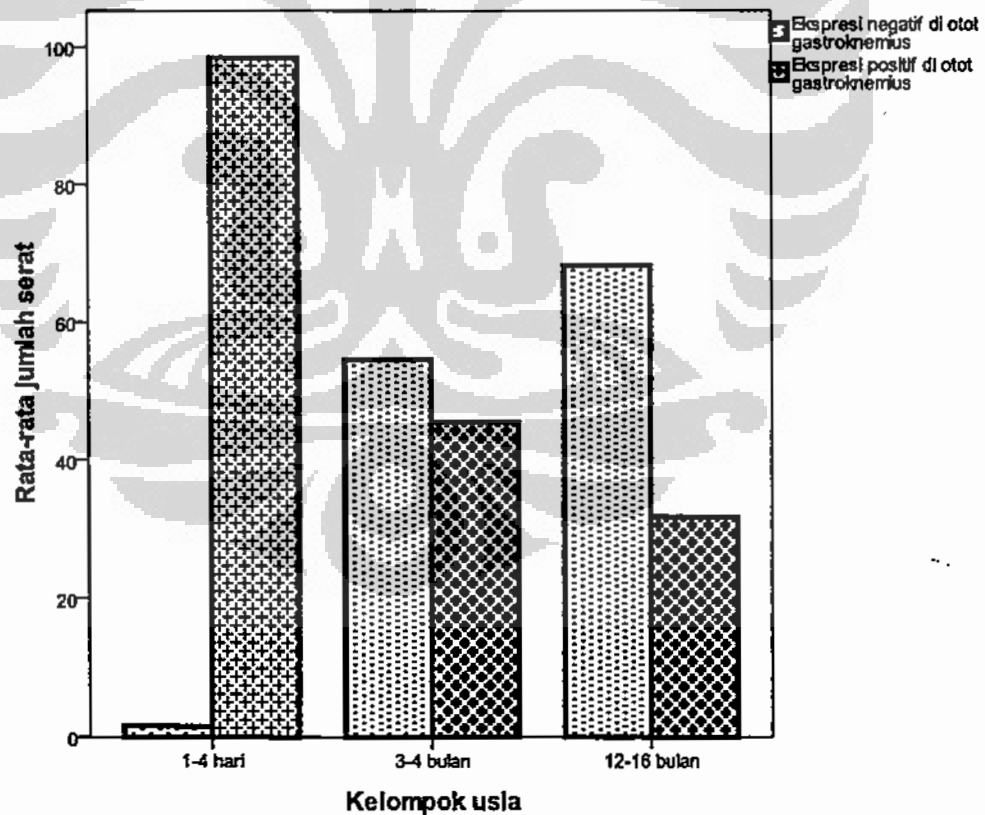


Ekspresi TNC didapatkan positif pada semua kelompok usia. Ekspresi positif paling banyak didapatkan pada kelompok usia 1-4 hari, sedangkan paling sedikit pada kelompok usia 12-16 bulan. (Tabel 4.3, Grafik 4.3, Grafik 4.4)

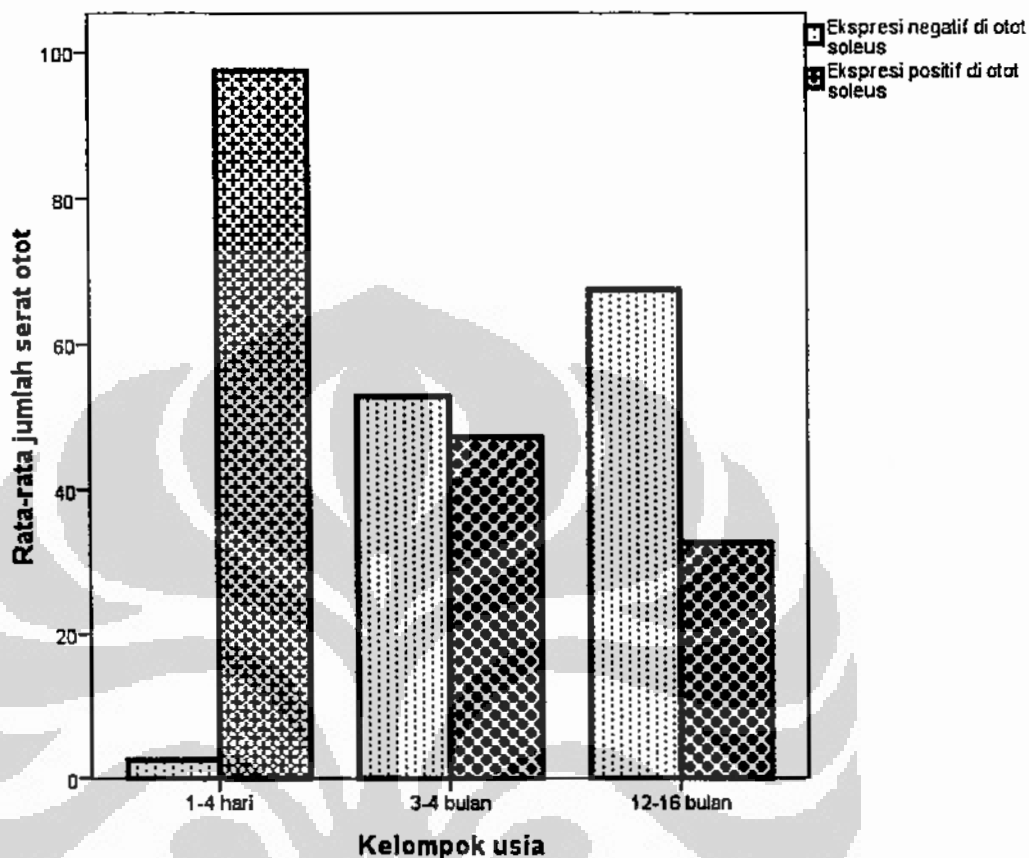
Tabel 4.3. Jumlah serat otot rangka yang menunjukkan ekspresi TNC negatif dan positif

Kelompok Usia	Gastroknemius		Soleus	
	Negatif	Positif	Negatif	Positif
1-4 Hari	1,56±0,88	98,44±0,88	2,56±1,51	97,44±1,51
3-4 Bulan	54,56±1,13	45,44±1,13	52,78±1,20	47,22±1,20
12-16 Bulan	68,22±1,39	31,78±1,39	67,44±1,81	32,56±1,81

Grafik 4.3. Perbandingan jumlah serat otot yang menunjukkan ekspresi TNC positif dan negatif pada otot gastroknemius ketiga kelompok usia



Grafik 4.4. Perbandingan jumlah serat otot yang menunjukkan ekspresi TNC positif dan negatif pada otot soleus ketiga kelompok usia



Uji normalitas dan homogenitas varians pada data jumlah serat di otot gastroknemius dan otot soleus yang menunjukkan ekspresi positif dan negatif terhadap TNC menunjukkan distribusi normal dan homogen. Uji *One-Way* Anova menunjukkan bahwa perbedaan jumlah serat otot yang menunjukkan ekspresi positif terhadap TNC pada kedua jenis otot antar kelompok usia berbeda bermakna ($p = 0,001$). Analisis perbandingan dengan LSD menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok usia satu dengan yang lain.

Hasil penelitian ini menunjukkan serat otot rangka pada semua subyek positif untuk pewarnaan TNC. Perbedaan hasil ini disebabkan oleh pemilihan antibodi primer TNC. Antibodi primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah *goat polyclonal anti-human tenascin C* pada N-terminus (sc-9871) untuk pewarnaan imunofloresen. Kemungkinan reaksi silang antara antibodi primer yang dipakai dalam penelitian ini dengan epitop jaringan yang memiliki

kemiripan belum dapat dihindarkan. Perlu dipertimbangkan untuk pemakaian antibodi primer yang dapat mengenali domain spesifik TNC dan khusus untuk imunohistokimia blok parafin.

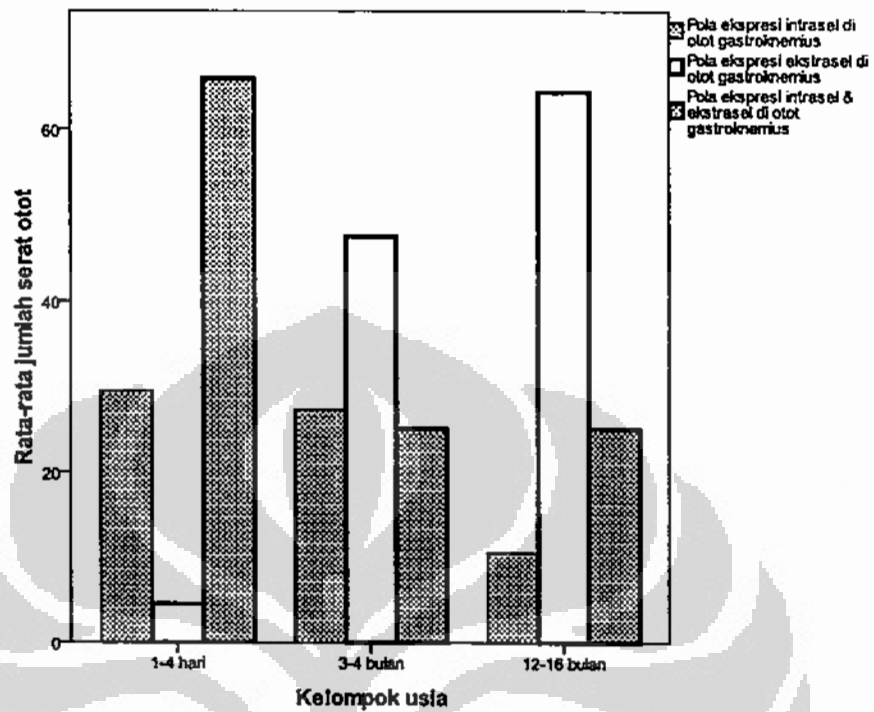
Hasil positif TNC dibagi lagi berdasarkan pola ekspresinya menjadi positif intra sel, positif ekstra sel dan kombinasi. Pola ekspresi TNC yang sering ditemukan di kelompok usia 1-4 hari adalah pola kombinasi dan intra sel. Pola ekspresi TNC ekstrasel lebih sering ditemukan di kelompok usia 3-4 bulan dan kelompok usia 12-16 bulan, dibandingkan kelompok usia 1-4 hari. (Tabel 4.4, Grafik 4.5, Grafik 4.6)

Tabel 4.4. Perbandingan jumlah serat otot rangka dengan ekspresi TNC positif berdasarkan pola ekspresi

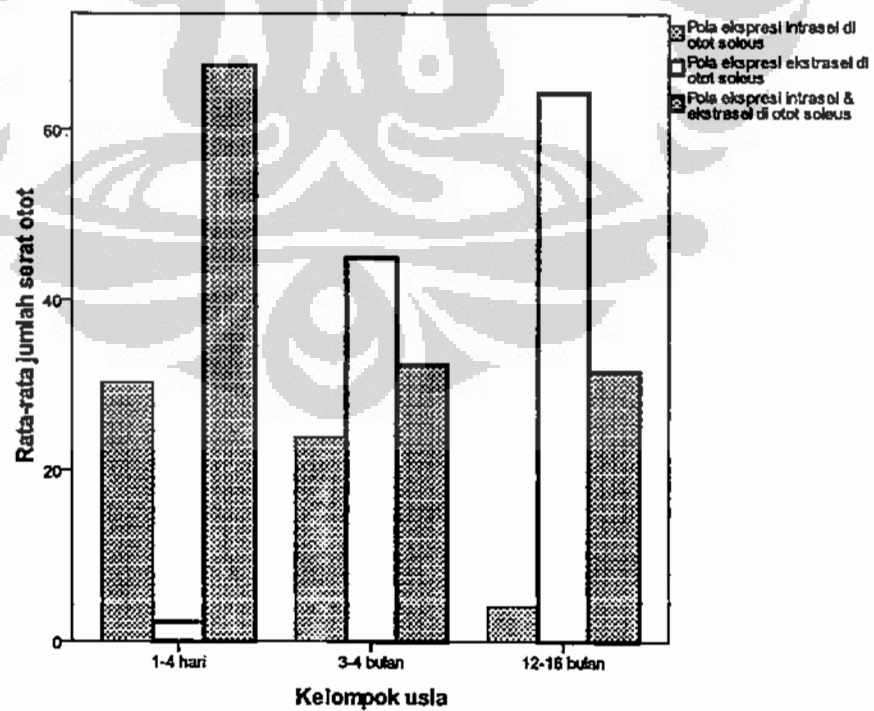
Berkas Otot	Pola Ekspresi	Kelompok Usia		
		1-4 Hari	3-4 Bulan	12-16 Bulan
Gastroknemius	Intra sel	29,56±1,51	27,33±1,58	10,56±1,67
	Ekstra sel	4,56±1,33	47,56±1,81	64,33±1,58
	Kombinasi	65,89±2,62	25,11±1,83	25,11±2,76
Soleus	Intra sel	30,22±1,39	23,89±1,05	4,11±1,27
	Ekstra sel	2,22±0,97	44,89±2,03	64,33±2,12
	Kombinasi	67,56±2,07	32,33±3,78	31,56±2,69

Secara statistik, pola ekspresi TNC secara imunohistokimia memberikan gambaran proses sintesis dan transpor protein TNC di serat otot rangka. Ekspresi TNC di intra sel (sitoplasmik) serat otot rangka menandakan TNC disintesis di serat otot rangka, selain oleh sel-sel matriks ekstrasel seperti fibroblas. Ekspresi TNC di ekstrasel (membran serat otot rangka) menandakan transpor protein TNC dari serat otot rangka ke matriks ekstrasel serat otot. Ekspresi TNC di intra- dan ekstrasel serat otot rangka menandakan serat otot rangka tersebut aktif mensintesis dan mentranspor TNC ke matriks ekstrasel serat otot rangka.

Grafik 4.5. Perbandingan pola ekspresi TNC pada otot gastroknemius ketiga kelompok usia



Grafik 4.6. Perbandingan pola ekspresi TNC pada otot soleus ketiga kelompok usia

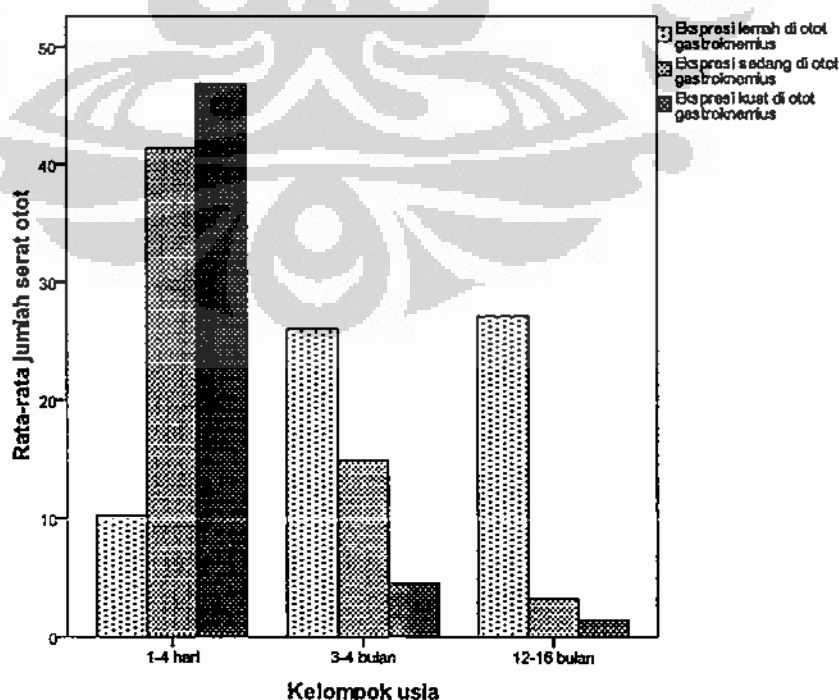


Berdasarkan skor intensitas, maka positivitas TNC dibagi menjadi 3 tingkat intensitas, yakni skor 1 (terwarnai lemah), skor 2 (terwarnai sedang) dan skor 3 (terwarnai kuat). Ekspresi kuat (skor 3) terhadap TNC paling sering ditemukan di kelompok usia 1-4 hari. Ekspresi lemah (skor 1) paling sering ditemukan di kelompok usia 12-16 bulan. (Tabel 4.5, Grafik 4.7, Grafik 4.8)

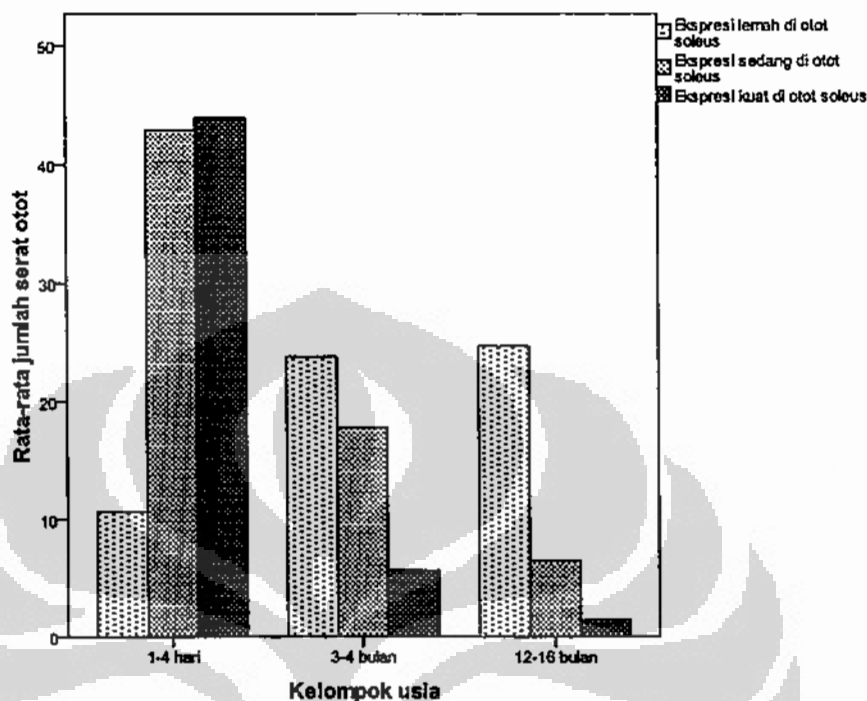
Tabel 4.5. Perbandingan jumlah serat otot rangka dengan ekspresi TNC positif berdasarkan intensitas pewarnaan

Berkas Otot	Intensitas Pewarnaan	Kelompok Usia		
		1-4 Hari	3-4 Bulan	12-16 Bulan
Gastroknemius	Lemah (+1)	10,22±2,22	26,00±2,65	27,11±1,05
	Sedang (+2)	41,33±2,59	14,89±2,32	3,22±1,20
	Kuat (+3)	46,89±3,06	4,56±1,67	1,44±0,73
Soleus	Lemah (+1)	10,67±1,58	23,78±1,39	24,67±1,00
	Sedang (+2)	42,89±1,90	17,78±2,64	6,44±1,33
	Kuat (+3)	43,89±2,57	5,67±1,32	1,44±1,24

Grafik 4.7. Perbandingan jumlah serat otot gastroknemius dengan ekspresi TNC positif berdasarkan intensitas pewarnaan



Grafik 4.8. Perbandingan jumlah serat otot soleus dengan ekspresi TNC positif berdasarkan intensitas pewarnaan



Secara statistik, jumlah sel yang menunjukkan ekspresi kuat (skor 3) dan sedang (skor 2) terhadap TNC di otot gastroknemius maupun otot soleus pada ketiga kelompok usia berbeda bermakna. Namun, jumlah sel yang menunjukkan ekspresi lemah (skor 1) terhadap TNC di kedua otot tersebut antara kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan tidak ada perbedaan bermakna.

Berdasarkan penelitian Flück dkk, pemberian beban mekanik dapat menginduksi ekspresi TNC di otot rangka.²¹ Sintesis protein TNC berlangsung di dalam sel, kemudian ditranspor keluar sel. Lokasi ekspresi secara imunohistokimia menggambarkan keberadaan molekul TNC di dalam sel saat disintesis di dalam sitoplasma, dan di luar sel ketika aktif bekerja sebagai protein matriks ekstrasel. Lokasi ekspresi TNC di intra- dan ekstrasel (kombinasi) menggambarkan keadaan serat otot rangka yang aktif mensintesis dan mentranspor TNC ke matriks ekstrasel.

Dari penelitian ini diketahui bahwa ekspresi kombinasi dan intra sel lebih banyak ditemukan pada kelompok usia 1-4 hari, sedangkan ekspresi ekstrasel

lebih banyak ditemukan pada kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan. Diduga otot rangka tikus kelompok usia 1-4 hari aktif mensintesis TNC dan sebagian ditranspor ke matriks ekstrasel, namun lebih banyak yang disimpan di dalam sitoplasma. Sedangkan pada otot rangka tikus kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan diduga kebutuhan akan TNC untuk remodeling dan regenerasi otot meningkat sehingga TNC lebih banyak yang ditranspor ke matriks ekstrasel. Dugaan lainnya adalah pada otot rangka tikus kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan, sel yang lebih aktif mensintesis TNC adalah sel fibroblas. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian ini bahwa serat otot tikus kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan lebih banyak yang negatif mengekspresikan TNC.

Penelitian tesis ini belum sampai meneliti ekspresi TNC pada tingkat molekuler. Penelitian lebih lanjut dengan model hewan TNC -/- diperlukan untuk mengetahui peran TNC pada remodeling matriks ekstrasel setelah trauma dan pengaruh beban mekanik lainnya.

4.5. Hubungan antara Ekspresi Tenasin-C dengan Jumlah dan Diameter Serat Otot Rangka

Dari analisis korelasi bivariat Pearson ditemukan korelasi positif yang bermakna antara pola ekspresi ekstra sel TNC dengan jumlah dan diameter serat otot rangka pada otot gastroknemius maupun otot soleus ($p = 0,001$). Pola ekspresi intra sel dan kombinasi menunjukkan korelasi negatif yang bermakna dengan jumlah dan diameter serat otot rangka pada otot gastroknemius maupun otot soleus ($p = 0,001$). Demikian pula ditemukan korelasi positif yang bermakna antara ekspresi lemah terhadap TNC (skor 1) dengan jumlah dan diameter serat otot rangka pada otot gastroknemius maupun otot soleus ($p = 0,001$). Korelasi negatif yang bermakna ditemukan antara ekspresi sedang dan kuat dengan jumlah dan diameter serat otot rangka otot gastroknemius dan otot soleus ($p = 0,001$).

Tabel 4.6. Korelasi bivariat pola ekspresi TNC dengan jumlah dan diameter serat otot rangka

		Correlations			
		Jumlah serat otot gastroknemius	Diameter serat otot gastroknemius	Jumlah serat otot soleus	Diameter serat otot soleus
Pola ekspresi intra sel di otot gastroknemius	Pearson Correlation	-.668**	-.904**		
	Sig. (2-tailed)	.000	.000		
	N	27	27		
Pola ekspresi ekstrasel di otot gastroknemius	Pearson Correlation	.984**	.965**		
	Sig. (2-tailed)	.000	.000		
	N	27	27		
Pola ekspresi intra sel & ekstrasel di otot gastroknemius	Pearson Correlation	-.984**	-.856**		
	Sig. (2-tailed)	.000	.000		
	N	27	27		
Pola ekspresi intra sel di otot soleus	Pearson Correlation			-.688**	-.858**
	Sig. (2-tailed)			.000	.000
	N			27	27
Pola ekspresi ekstrasel di otot soleus	Pearson Correlation			.950**	.995**
	Sig. (2-tailed)			.000	.000
	N			27	27
Pola ekspresi intra sel & ekstra sel di otot soleus	Pearson Correlation			-.984**	-.948**
	Sig. (2-tailed)			.000	.000
	N			27	27

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabel 4.7. Korelasi bivariat intensitas pewarnaan TNC dengan jumlah dan diameter serat otot rangka

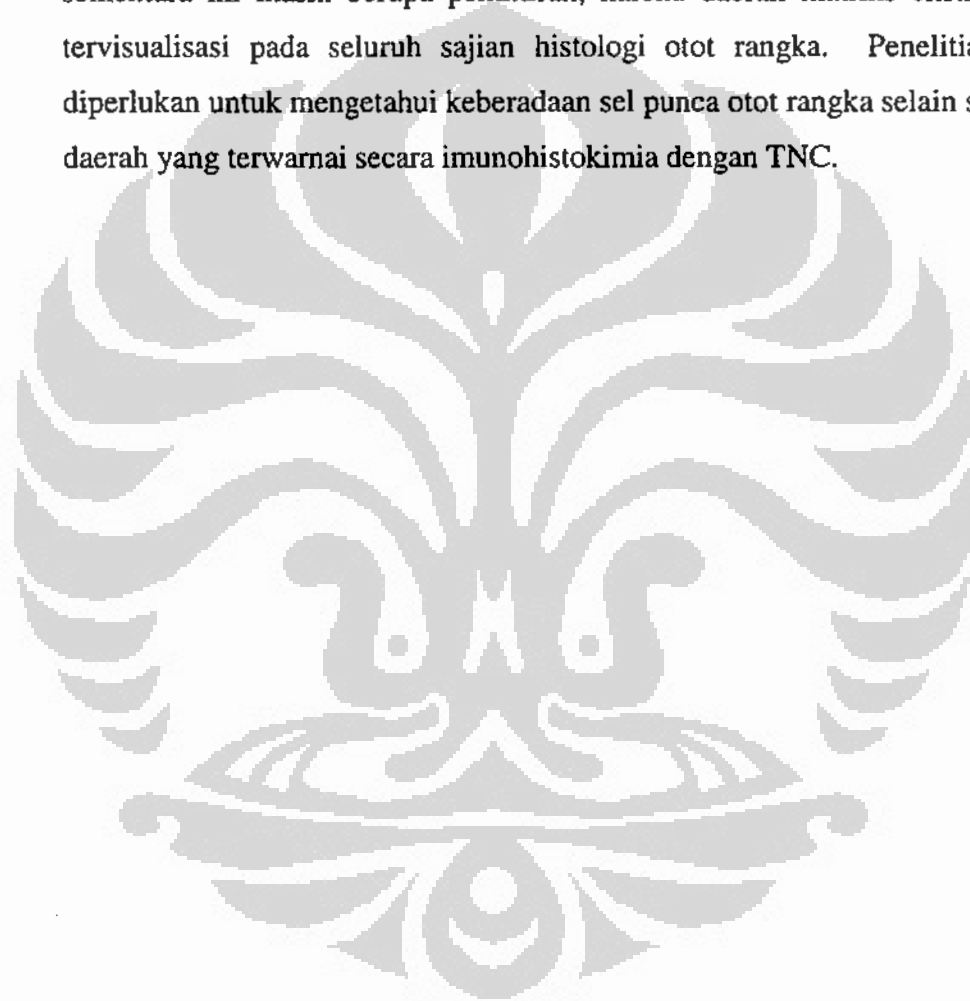
		Jumlah serat otot gastroknemius	Diameter serat otot gastroknemius	Jumlah serat otot soleus	Diameter serat otot soleus
Ekspresi lemah di otot gastroknemius	Pearson Correlation	.968**	.860**		
	Sig. (2-tailed)	.000	.000		
	N	27	27		
Ekspresi sedang di otot gastroknemius	Pearson Correlation	-.972**	-.964**		
	Sig. (2-tailed)	.000	.000		
	N	27	27		
Ekspresi kuat di otot gastroknemius	Pearson Correlation	-.993**	-.890**		
	Sig. (2-tailed)	.000	.000		
	N	27	27		
Ekspresi lemah di otot soleus	Pearson Correlation			.973**	.948**
	Sig. (2-tailed)			.000	.000
	N			27	27
Ekspresi sedang di otot soleus	Pearson Correlation			-.949**	-.989**
	Sig. (2-tailed)			.000	.000
	N			27	27
Ekspresi kuat di otot soleus	Pearson Correlation			-.982**	-.972**
	Sig. (2-tailed)			.000	.000
	N			27	27

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Penelitian ini membuktikan bahwa seiring dengan penambahan usia, terjadi penurunan ekspresi TNC, baik dalam jumlah serat otot rangka yang positif

mengekspresikan TNC maupun intensitas pewarnaan TNC. Selain itu juga terdapat perbedaan pola ekspresi TNC di otot rangka tikus kelompok usia 1-4 hari, 3-4 bulan, dan 12-16 bulan. Didapatkan juga korelasi antara ekspresi TNC dengan jumlah dan diameter serat otot rangka. Dari hal-hal ini kita memperkirakan bahwa pemberian TNC eksogen dapat berperan sebagai agen anti penuaan (apoptosis) serat otot rangka.

Pemanfaatan TNC sebagai penanda lingkungan mikro sel punca otot rangka sementara ini masih berupa pemikiran, karena daerah matriks ekstra sel tidak tervisualisasi pada seluruh sajian histologi otot rangka. Penelitian lanjutan diperlukan untuk mengetahui keberadaan sel punca otot rangka selain sel satelit di daerah yang terwarnai secara imunohistokimia dengan TNC.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari analisa hasil dan diskusi dalam penelitian ini, dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

- i. Ekspresi TNC didapatkan pada otot rangka semua kelompok usia
- ii. Seiring bertambahnya usia otot rangka, terjadi:
 - a. Peningkatan jumlah serat otot rangka
 - b. Peningkatan diameter serat otot rangka
 - c. Penurunan jumlah serat otot rangka yang positif mengekspresikan TNC, terutama yang berekspresi kuat (skor 3)
 - d. Perubahan pola ekspresi TNC, dari lebih banyak sel yang menunjukkan pola ekspresi intra sel dan kombinasi pada kelompok usia 1-4 hari menjadi lebih banyak sel yang menunjukkan pola ekspresi ekstra sel pada kelompok usia 12-16 bulan.
- iii. Korelasi positif yang bermakna ditemukan antara:
 - a. Pola ekspresi ekstra sel dengan jumlah dan diameter serat otot rangka
 - b. Ekspresi lemah dengan jumlah dan diameter serat otot rangka
- iv. Korelasi negatif yang bermakna ditemukan antara:
 - a. Ekspresi sedang dengan jumlah dan diameter serat otot rangka
 - b. Ekspresi kuat dengan jumlah dan diameter serat otot rangka
 - c. Pola ekspresi intra sel dengan jumlah dan diameter serat otot rangka
 - d. Pola ekspresi kombinasi dengan jumlah dan diameter serat otot rangka

5.2. Saran

- i. Memilih antibodi primer anti-TNC untuk domain yang spesifik.
- ii. Menambah kelompok usia tikus, antara lain kelompok usia 6 bulan, 9 bulan, 15 bulan, dan 18 bulan sehingga dapat lebih menggambarkan proses perkembangan atau penuaan.
- iii. Lebih memperhatikan tahap pemrosesan jaringan sehingga memberikan hasil yang optimum.

DAFTAR PUSTAKA

1. Fawcett DW. Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology. 12th ed. New York: Chapman and Hall; 1994.
2. Tamaki T, Akatsuka A, Yoshimura S, Roy RR, Edgerton VR. New Fiber Formation in the Interstitial Spaces of Rat Skeletal Muscle During Postnatal Growth. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2002; 50(8):1097-1111.
3. Lewis SEM, Kelly FJ, Goldspink DF. Pre- and post-natal growth and protein turnover in smooth muscle, heart and slow- and fast-twitch skeletal muscles of the rat. *Biochem. J.* 1984; 217:517-26.
4. Goldspink G, Ward P S. Changes in rodent muscle fibre types during post-natal growth, undernutrition and exercise. *J. Physiol.* 1979; 296:453-469
5. Ho KW, Roy RR, Tweedle CD, Heusner WW, Van Huss WD, Carrow RE. Skeletal muscle fiber splitting with weight-lifting exercise in rats. *Am J Anat.* 1980 Apr; 157(4):433-40.
6. Le Grand F, Rudnicki MA. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 December; 19(6):628-633.
7. Hurme T, Kalimo H. Adhesion in skeletal muscle during regeneration. *Muscle Nerve.* 1992 Apr; 15(4):482-9.
8. Jones FS, Jones PL. The Tenascin Family of ECM Glycoproteins: Structure, Function, and Regulation During Embryonic Development and Tissue Remodeling. *Dev Dyn* 2000; 218:235-59.
9. Cifuentes-Diaz C, Faille L, Goudou D, Schachner M, Rieger F, Angaut-Petit D. Abnormal reinnervation of skeletal muscle in a tenascin-C-deficient mouse. *Journal of Neuroscience Research* 2001; 67(1):93-99.
10. Wallner K, Li C, Fishbein MC, Shah PK, Sharifi BG. Arterialization of Human Vein Grafts Is Associated With Tenascin-C Expression. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:871-5.
11. Jarvinen T, Jozsa L, Kannus P, et al. Mechanical loading regulates the expression of tenascin-c in the myotendonous junction and tendon but does not induce de novo synthesis in skeletal muscle. *J of Cell Science* 2003; 116:857-866.

12. Swindle CS, Tran KT, Johnson TD, Banerjee P, Mayes AM, Griffith L, et al. Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. *The Journal of Cell Biology*, July 23, 2001; 154(2):459-68.
13. Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 1986; 47: 131-139.
14. Järvinen TAH, Jozsa L, Kannus P, Järvinen TLN, Kvist M, Hurme T, et al. Mechanical loading regulates tenascin-C expression in the osteotendinous Junction. *Journal of Cell Science* 1999; 112:3157-66.
15. Yanagisawa M, Yu RK. The Expression and Functions of Glycoconjugates in Neural Stem Cells. *Glycobiology* 2007.
16. Wang LC, Kernell D. Quantification of fibre type regionalisation: an analysis of lower hindlimb muscles in the rat. *J. Anat.* 2001; 198:295-308.
17. Timson BF, Dudenhoefter GA. Skeletal muscle fibre number in the rat from youth to adulthood. *J. Anat.* 1990; 173, 33-36.
18. Williams GN, Higgins MJ, Lewek MD. Aging skeletal muscle: physiologic changes and the effects of training. *Phys Ther.* 2002;82:62-68.
19. Nicks DK, Beneke WM, Key RM, Timson BF. Muscle fibre size and number following immobilization atrophy. *J. Anat.* 1989; 163, pp. 1-5 1.
20. Siu PM, Pistilli EE, and Always SE. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: R1015-R1026.
21. Flück M, Mund S, Schittny J, Durieux AC, Giraud MN. Tenascin-C-deficiency accelerates mechano- and age-dependent skeletal muscle atrophy. *The FASEB Journal.* 2007; 21:1b537.
22. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84:209-238.
23. Zagzag D, Shiff B, Jallo GI, Greco MA, Blanco Cy, Cohen H et al. Tenascin-C Promotes Microvascular Cell Migration and Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase. *Cancer Research* May 1, 2002; 62:2660-8.

24. Nishio T, Kawaguchi S, Iseda T, Kawasaki T, Hase T. Secretion of tenascin-C by cultured astrocytes: regulation of cell proliferation and process elongation. *Brain Research* 14 November 2003; 990(1-2):129-40.
25. Tablin F, Rabier MJ, Walker NJ, Velasco VM, Field CL, Leven RM. Tenascin-C is Synthesised and Secreted by Megakaryocytes, whose Adherence to Intact Tenascin is Mediated by the Integrin Subunit $\beta 1$. *Comparative Haematology International* (1998) 8:142-9.
26. Gatchalian CL, Schachner M, Sanes JR. Fibroblasts that Proliferate Near Denervated Synaptic Sites in Skeletal Muscle Synthesize the Adhesive Molecules Tenascin(J1), N-CAM, Fibronectin, and a Heparan Sulfate Proteoglycan. *The Journal of Cell Biology*, May 1989; 108:1873-90.
27. Latijnhouwers M, Bergers M, Ponc M, Dijkman H, Andriessen M, Schalkwijk J. Human Epidermal Keratinocytes Are a Source of Tenascin-C during Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 1997; 108:776-83.
28. Zagzag D, Friedlander DR, Dosik J, Chikramane S, Chan W, Greco MA et al. Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro. *Cancer Res.* 1996 Jan 1; 56(1):182-9.
29. Soini Y, Kamel D, Apaja-Sarkkinen M, Virtanen I, Lehto V-P. Tenascin immunoreactivity in normal and pathological bone marrow. *Clin Pathol* 1993; 46:218-21.
30. De Wever O, Nguyen QD, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, et al. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J.* 2004 Jun; 18(9):1016-8.
31. Introduction to Immunohistochemistry. Diunduh dari halaman utama <http://www.ihcworld.com/introduction> pada tanggal 15 September 2008.
32. Hanekamp EE, Gielen SCJP, Smid-Koopman E, Kühne LCM, de Ruyter PE, Chadha-Ajwani S et al. Consequences of Loss of Progesterone Receptor Expression in Development of Invasive Endometrial Cancer. *Clinical Cancer Research* September 15, 2003; 9:4190-9.

33. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The Role of Stem Cells in Skeletal and Cardiac Muscle Repair. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2002; 50(5): 589–610.
34. How old is a rat in human years? Tabel diterjemahkan dan dimodifikasi dari <http://www.ratbehavior.org>.
35. Sevilla ALC. Hypertrophy and Hyperplasia: Adaptations of Muscular Tissue to Various Resistance Training Protocols. March 2, 2003.
36. Rayne J, Crawford GNC. Increase in fibre number of the rat pterygoid muscles during postnatal growth. *Journal of Anatomy* 1975; 119:347-357.
37. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 2000; 218:115-24.
38. Immunohistochemistry Process. Diunduh dari <http://www.millipore.com>
39. Bourdon MA, Wikstrand CJ, Furthmayer H, Matthews TJ, Bigner DD. Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen. *Cancer Res* 1983; 43:2796-2805.
40. Chiquet M, Fambrough DM. Chick myotendinous antigen. I. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis. *J Cell Biol* 1984; 98:1926–36.
41. Erickson HP, Iglesias JL. A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations. *Nature* 1984;311:267–9.
42. Grumet M, Hoffman S, Crossin KL, Edelman GM. Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8075–9.
43. Kruse J, Keilhauer G, Faissner A, Timpl R, Schachner M. The J1 glycoprotein—a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature* 1985; 316:146–8.
44. Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 1986;47:131–9.
45. Rettig WJ, Triche TJ, Garin-Chesa P. Stimulation of human neuronectin secretion by brain-derived growth factors. *Brain Res* 1989; 487:171–7.

Lampiran 1: Keterangan Lolos Kaji Etik



Jl. Percetakan Negara No. 29
Jakarta 10560
Kotak Pos 1226 Jakarta 10012
Telp. (021) 4261068

DEPARTEMEN KESEHATAN R.I.
BADAN PENELITIAN DAN
PENGEMBANGAN KESEHATAN



Faks. (021) 4243933
E-mail : subhan@litbang.deptkes.go.id
Website : <http://www.litbang.deptkes.go.id>

PERSETUJUAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE)

Nomor : **IS.03.02/IS/1529/2008**

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Litbang Kesehatan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul:

**"Kajian lingkungan mikro sel punca pada sistem organ tikus Sprague-Dawley neonatus, dewasa, dan senilis"
(Revisi protokol tanggal 6 Juni 2008)**

yang menggunakan / memanfaatkan hewan percobaan sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana/Peneliti Utama:

Prof.dr. Jeanne A. Pawitan, MS, Ph.D

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol penelitian.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-BPPK. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 6 Juni 2008

Ketua
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Badan Litbang Kesehatan,



Prof. Dr. M. Sudomo

Lampiran 2: Rekapitulasi Data Subyek Penelitian

Subyek	Otot Gastroknemius											
	Z serat	Ø serat (µm)	TNC 0	TNC +	TNC 1	TNC 2	TNC 3	Intrasel	Ekstrasel	Intra+Ekstra		
Neonatus1	3147	5.61	1	99	9	41	49	29	3	68		
Neonatus2	3206	5.72	2	98	10	43	45	31	5	64		
Neonatus3	3119	5.54	1	99	14	37	48	32	7	61		
Neonatus4	3147	5.65	3	97	13	40	44	28	4	68		
Neonatus5	3201	5.48	2	98	11	44	43	30	4	66		
Neonatus6	3092	5.57	2	98	8	39	51	31	6	63		
Neonatus7	3174	5.75	0	100	8	45	47	29	3	68		
Neonatus8	2994	5.59	2	98	11	43	44	28	4	68		
Neonatus9	3065	5.87	1	99	8	40	51	28	5	67		
Remaja1	10843	21.17	56	44	32	10	2	27	49	24		
Remaja2	10566	20.02	53	47	25	17	5	28	48	24		
Remaja3	10707	22.48	55	45	22	17	6	26	50	24		
Remaja4	11162	23.88	56	44	26	15	3	26	47	27		
Remaja5	11398	23.74	55	45	25	17	3	27	50	23		
Remaja6	10965	22.41	55	45	26	15	4	25	46	29		
Remaja7	10712	21.01	54	46	27	13	6	28	47	25		
Remaja8	10189	23.07	53	47	26	14	7	30	45	25		
Remaja9	10350	21.49	54	46	25	16	5	29	46	25		
Dewasa1	11534	38.34	68	32	27	4	1	10	63	27		
Dewasa2	11949	38.99	68	32	26	4	2	9	62	29		
Dewasa3	12047	38.34	69	31	27	3	1	11	63	26		
Dewasa4	12257	37.92	66	34	29	3	2	12	64	24		
Dewasa5	12009	39.99	67	33	28	5	0	8	64	28		
Dewasa6	11933	37.65	70	30	26	2	2	11	66	23		
Dewasa7	12117	39.34	70	30	27	1	2	12	67	21		
Dewasa8	11988	36.67	67	33	28	3	2	13	65	22		
Dewasa9	10974	40.29	69	31	26	4	1	9	65	26		

Subyek	Otot Soleus									
	Σ serat	ϕ serat (μm)	TNC 0	TNC +	TNC 2	TNC 3	Intrasel	Ekstrasel	Intra+Ekstra	
Neonatus1	298	5.33	2	98	43	45	30	2	68	
Neonatus2	309	5.43	3	97	45	41	31	1	68	
Neonatus3	286	5.54	2	98	42	43	29	3	68	
Neonatus4	321	5.34	5	95	46	40	32	4	64	
Neonatus5	309	5.35	4	96	41	43	29	2	69	
Neonatus6	332	5.46	3	97	40	46	28	1	71	
Neonatus7	321	5.48	1	99	44	43	31	2	67	
Neonatus8	309	5.52	0	100	42	48	32	3	65	
Neonatus9	286	5.32	3	97	43	46	30	2	68	
Remaja1	2689	19.36	53	47	20	4	23	44	33	
Remaja2	2771	22.67	52	48	20	6	22	43	35	
Remaja3	3140	22.45	54	46	17	5	24	46	30	
Remaja4	3351	22.17	55	45	14	6	25	47	28	
Remaja5	2577	20.45	53	47	15	6	23	42	35	
Remaja6	2518	20.11	52	48	19	4	24	43	33	
Remaja7	2885	21.66	51	49	22	5	25	46	39	
Remaja8	3116	21.25	53	47	17	7	24	45	31	
Remaja9	2751	19.87	52	48	16	8	25	48	27	
Dewasa1	3078	27.91	66	34	7	2	2	62	36	
Dewasa2	2814	27.17	65	35	8	3	4	61	35	
Dewasa3	2946	27.25	69	31	6	0	5	64	31	
Dewasa4	2778	27.67	68	32	7	2	3	67	30	
Dewasa5	3264	28.65	67	33	4	3	6	64	30	
Dewasa6	2910	26.26	65	35	7	2	4	63	33	
Dewasa7	3005	28.13	70	30	5	0	5	67	28	
Dewasa8	2750	26.89	69	31	6	1	3	65	32	
Dewasa9	2878	29.11	68	32	8	0	5	66	29	

A. Analisa Jumlah Serat Otot

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Jumlah serat otot gastroknemius	Jumlah serat otot soleus
N		27	27
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	8586.85	2036.74
	Std. Deviation	3972.296	1259.070
Most Extreme Differences	Absolute	.323	.316
	Positive	.246	.245
	Negative	-.323	-.316
Kolmogorov-Smirnov Z		1.680	1.640
Asymp. Sig. (2-tailed)		.007	.009

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Jumlah serat otot gastroknemius	4.001	2	24	.032
Jumlah serat otot soleus	10.470	2	24	.001

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Kelompok usia	N	Mean Rank
Jumlah serat otot gastroknemius	1-4 hari	9	5.00
	3-4 bulan	9	14.22
	12-16 bln	9	22.78
	Total	27	
Jumlah serat otot soleus	1-4 hari	9	5.00
	3-4 bulan	9	17.44
	12-16 bln	9	19.56
	Total	27	

Test Statistics^{a,b}

	Jumlah serat otot gastroknemius	Jumlah serat otot soleus
Chi-Square	22.592	17.708
df	2	2
Asymp. Sig.	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok usia

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Kelompok usia	(J) Kelompok usia	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Jumlah serat otot gastroknemius	1-4 hari	3-4 bulan	-7638.556*	148.851	.000	-7945.77	-7331.34
		12-16 bln	-8740.333*	148.851	.000	-9047.55	-8433.12
	3-4 bulan	1-4 hari	7638.556*	148.851	.000	7331.34	7945.77
		12-16 bln	-1101.778*	148.851	.000	-1408.99	-794.56
Jumlah serat otot soleus	1-4 hari	3-4 bulan	-2558.556*	88.425	.000	-2741.05	-2376.06
		12-16 bln	-2628.000*	88.425	.000	-2810.50	-2445.50
	3-4 bulan	1-4 hari	2558.556*	88.425	.000	2376.06	2741.05
		12-16 bln	-69.444	88.425	.440	-251.94	113.05
	12-16 bln	1-4 hari	2628.000*	88.425	.000	2445.50	2810.50
		3-4 bulan	69.444	88.425	.440	-113.05	251.94

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

B. Analisa Diameter Serat Otot

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Diameter serat otot gastroknemius	Diameter serat otot soleus
N		27	27
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	22.1326	18.0667
	Std. Deviation	13.75172	9.55019
Most Extreme Differences	Absolute	.215	.239
	Positive	.215	.239
	Negative	-.188	-.221
Kolmogorov-Smirnov Z		1.116	1.239
Asymp. Sig. (2-tailed)		.165	.093

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Diameter serat otot gastroknemius	9.671	2	24	.001
Diameter serat otot soleus	12.378	2	24	.000

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Kelompok usia	N	Mean Rank
Diameter serat otot gastroknemius	1-4 hari	9	5.00
	3-4 bulan	9	14.00
	12-16 bln	9	23.00
	Total	27	
Diameter serat otot soleus	1-4 hari	9	5.00
	3-4 bulan	9	14.00
	12-16 bln	9	23.00
	Total	27	

Test Statistics^{a,b}

	Diameter serat otot gastroknemius	Diameter serat otot soleus
Chi-Square	23.150	23.143
df	2	2
Asymp. Sig.	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok usia

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Kelompok usia	(J) Kelompok usia	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% CI	
						Lower Bound	Upper Bound
Diameter serat otot gastroknemius	1-4 hari	3-4 bulan	-16.49889*	.47728	.000	-17.4839	-15.5138
		12-16 bln	-32.97222*	.47728	.000	-33.9573	-31.9872
	3-4 bulan	1-4 hari	16.49889*	.47728	.000	15.5138	17.4839
		12-16 bln	-16.47333*	.47728	.000	-17.4584	-15.4883
	12-16 bln	1-4 hari	32.97222*	.47728	.000	31.9872	33.9573
		3-4 bulan	16.47333*	.47728	.000	15.4883	17.4584
Diameter serat otot soleus	1-4 hari	3-4 bulan	-15.69111*	.40933	.000	-16.5359	-14.8463
		12-16 bln	-22.25222*	.40933	.000	-23.0970	-21.4074
	3-4 bulan	1-4 hari	15.69111*	.40933	.000	14.8463	16.5359
		12-16 bln	-6.56111*	.40933	.000	-7.4059	-5.7163
	12-16 bln	1-4 hari	22.25222*	.40933	.000	21.4074	23.0970
		3-4 bulan	6.56111*	.40933	.000	5.7163	7.4059

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

C. Analisa Ekspresi Tenasin-C

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekspresi negatif di otot gastroknemius	Ekspresi positif di otot gastroknemius	Ekspresi negatif di otot soleus	Ekspresi positif di otot soleus
N		27	27	27	27
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	41.44	58.56	40.93	59.07
	Std. Deviation	29.321	29.321	28.352	28.352
Most Extreme Differences	Absolute	.320	.320	.305	.305
	Positive	.238	.320	.231	.305
	Negative	-.320	-.238	-.305	-.231
Kolmogorov-Smirnov Z		1.662	1.662	1.587	1.587
Asymp. Sig. (2-tailed)		.008	.008	.013	.013

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ekspresi negatif di otot gastroknemius	1.213	2	24	.315
Ekspresi positif di otot gastroknemius	1.213	2	24	.315
Ekspresi negatif di otot soleus	1.200	2	24	.319
Ekspresi positif di otot soleus	1.200	2	24	.319

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ekspresi negatif di otot gastroknemius	Between Groups	22320.667	2	11160.333	8370.250	.000
	Within Groups	32.000	24	1.333		
	Total	22352.667	26			
Ekspresi positif di otot gastroknemius	Between Groups	22320.667	2	11160.333	8370.250	.000
	Within Groups	32.000	24	1.333		
	Total	22352.667	26			
Ekspresi negatif di otot soleus	Between Groups	20843.852	2	10421.926	4466.540	.000
	Within Groups	56.000	24	2.333		
	Total	20899.852	26			
Ekspresi positif di otot soleus	Between Groups	20843.852	2	10421.926	4466.540	.000
	Within Groups	56.000	24	2.333		
	Total	20899.852	26			

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekspresi negatif di otot gastroknemius	Ekspresi lemah di otot gastroknemius	Ekspresi sedang di otot gastroknemius	Ekspresi kuat di otot gastroknemius
N		27	27	27	27
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	41.44	21.11	19.81	17.63
	Std. Deviation	29.321	8.111	16.375	21.215
Most Extreme Differences	Absolute	.320	.314	.235	.358
	Positive	.238	.153	.235	.358
	Negative	-.320	-.314	-.186	-.217
Kolmogorov-Smirnov Z		1.662	1.631	1.221	1.863
Asymp. Sig. (2-tailed)		.008	.010	.102	.002

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ekspresi negatif di otot gastroknemius	1.213	2	24	.315
Ekspresi lemah di otot gastroknemius	1.203	2	24	.318
Ekspresi sedang di otot gastroknemius	2.538	2	24	.100
Ekspresi kuat di otot gastroknemius	9.772	2	24	.001

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ekspresi negatif di otot gastroknemius	Between Groups	22320.667	2	11160.333	8370.250	.000
	Within Groups	32.000	24	1.333		
	Total	22352.667	26			
Ekspresi lemah di otot gastroknemius	Between Groups	1606.222	2	803.111	184.545	.000
	Within Groups	104.444	24	4.352		
	Total	1710.667	26			
Ekspresi sedang di otot gastroknemius	Between Groups	6863.630	2	3431.815	759.500	.000
	Within Groups	108.444	24	4.519		
	Total	6972.074	26			

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Kelompok usia	N	Mean Rank
Ekspresi kuat di otot gastroknemius	1-4 hari	9	23.00
	3-4 bulan	9	13.72
	12-16 bln	9	5.28
	Total	27	

Test Statistics^{a,b}

	Ekspresi kuat di otot gastroknemius
Chi-Square	22.756
df	2
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok usia

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Kelompok usia	(J) Kelompok usia	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% CI	
						Lower Bound	Upper Bound
Ekspresi negatif di otot gastroknemius	1-4 hari	3-4 bulan	-53.000*	.544	.000	-54.12	-51.88
		12-16 bln	-66.667*	.544	.000	-67.79	-65.54
	3-4 bulan	1-4 hari	53.000*	.544	.000	51.88	54.12
		12-16 bln	-13.667*	.544	.000	-14.79	-12.54
		12-16 bln	1-4 hari	66.667*	.544	.000	65.54
	3-4 bulan	13.667*	.544	.000	12.54	14.79	
Ekspresi lemah di otot gastroknemius	1-4 hari	3-4 bulan	-15.778*	.983	.000	-17.81	-13.75
		12-16 bln	-16.889*	.983	.000	-18.92	-14.86
	3-4 bulan	1-4 hari	15.778*	.983	.000	13.75	17.81
		12-16 bln	-1.111	.983	.270	-3.14	.92
		12-16 bln	1-4 hari	16.889*	.983	.000	14.86
	3-4 bulan	1.111	.983	.270	-.92	3.14	
Ekspresi sedang di otot gastroknemius	1-4 hari	3-4 bulan	26.444*	1.002	.000	24.38	28.51
		12-16 bln	38.111*	1.002	.000	36.04	40.18
	3-4 bulan	1-4 hari	-26.444*	1.002	.000	-28.51	-24.38
		12-16 bln	11.667*	1.002	.000	9.60	13.73
		12-16 bln	1-4 hari	-38.111*	1.002	.000	-40.18
	3-4 bulan	-11.667*	1.002	.000	-13.73	-9.60	
Ekspresi kuat di otot gastroknemius	1-4 hari	3-4 bulan	42.333*	.969	.000	40.33	44.33
		12-16 bln	45.444*	.969	.000	43.45	47.44
	3-4 bulan	1-4 hari	-42.333*	.969	.000	-44.33	-40.33
		12-16 bln	3.111*	.969	.004	1.11	5.11
		12-16 bln	1-4 hari	-45.444*	.969	.000	-47.44
	3-4 bulan	-3.111*	.969	.004	-5.11	-1.11	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekspresi negatif di otot soleus	Ekspresi lemah di otot soleus	Ekspresi sedang di otot soleus	Ekspresi kuat di otot soleus
N		27	27	27	27
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	40.93	19.70	22.37	17.00
	Std. Deviation	28.352	6.650	15.641	19.533
Most Extreme Differences	Absolute	.305	.302	.203	.344
	Positive	.231	.177	.190	.344
	Negative	-.305	-.302	-.203	-.214
Kolmogorov-Smirnov Z		1.587	1.568	1.057	1.788
Asymp. Sig. (2-tailed)		.013	.015	.213	.003

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ekspresi negatif di otot soleus	1.200	2	24	.319
Ekspresi lemah di otot soleus	.972	2	24	.393
Ekspresi sedang di otot soleus	2.766	2	24	.083
Ekspresi kuat di otot soleus	4.038	2	24	.031

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Ekspresi negatif di otot soleus	Between Groups	20843.852	2	10421.926	4466.540	.000
	Within Groups	56.000	24	2.333		
	Total	20899.852	26			
Ekspresi lemah di otot soleus	Between Groups	1106.074	2	553.037	304.735	.000
	Within Groups	43.556	24	1.815		
	Total	1149.630	26			
Ekspresi sedang di otot soleus	Between Groups	6261.630	2	3130.815	761.550	.000
	Within Groups	98.667	24	4.111		
	Total	6360.296	26			

Kruskal-Wallis Test

Ranks

		Kelompok usia	N	Mean Rank
Ekspresi kuat di otot soleus	1-4 hari		9	23.00
	3-4 bulan		9	14.00
	12-16 bln		9	5.00
	Total		27	

Test Statistics^{a,b}

		Ekspresi kuat di otot soleus
Chi-Square		23.285
df		2
Asymp. Sig.		.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok usia

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Kelompok usia	(J) Kelompok usia	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Ekspresi negatif di otot soleus	1-4 hari	3-4 bulan	-50.222*	.720	.000	-51.71	-48.74
		12-16 bl	-64.889*	.720	.000	-66.38	-63.40
	3-4 bulan	1-4 hari	50.222*	.720	.000	48.74	51.71
		12-16 bln	-14.667*	.720	.000	-16.15	-13.18
	12-16 bln	1-4 hari	64.889*	.720	.000	63.40	66.38
		3-4 bulan	14.667*	.720	.000	13.18	16.15
Ekspresi lemah di otot soleus	1-4 hari	3-4 bulan	-13.111*	.635	.000	-14.42	-11.80
		12-16 bln	-14.000*	.635	.000	-15.31	-12.69
	3-4 bulan	1-4 hari	13.111*	.635	.000	11.80	14.42
		12-16 bln	-.889	.635	.174	-2.20	.42
	12-16 bln	1-4 hari	14.000*	.635	.000	12.69	15.31
		3-4 bulan	.889	.635	.174	-.42	2.20
Ekspresi sedang di otot soleus	1-4 hari	3-4 bulan	25.111*	.956	.000	23.14	27.08
		12-16 bln	36.444*	.956	.000	34.47	38.42
	3-4 bulan	1-4 hari	-25.111*	.956	.000	-27.08	-23.14
		12-16 bln	11.333*	.956	.000	9.36	13.31
	12-16 bln	1-4 hari	-36.444*	.956	.000	-38.42	-34.47
		3-4 bulan	-11.333*	.956	.000	-13.31	-9.36
Ekspresi kuat di otot soleus	1-4 hari	3-4 bulan	38.222*	.856	.000	36.46	39.99
		12-16 bln	42.444*	.856	.000	40.68	44.21
	3-4 bulan	1-4 hari	-38.222*	.856	.000	-39.99	-36.46
		12-16 bln	4.222*	.856	.000	2.46	5.99
	12-16 bln	1-4 hari	-42.444*	.856	.000	-44.21	-40.68
		3-4 bulan	-4.222*	.856	.000	-5.99	-2.46

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Pola ekspresi intra sel di otot gastroknemius	Pola ekspresi ekstra sel di otot gastroknemius	Pola ekspresi intra sel & ekstra sel di otot gastroknemius
N		27	27	27
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	22.48	38.81	38.70
	Std. Deviation	8.777	25.700	19.729
Most Extreme Differences	Absolute	.285	.262	.355
	Positive	.193	.225	.355
	Negative	-.285	-.262	-.204
Kolmogorov-Smirnov Z		1.483	1.360	1.846
Asymp. Sig. (2-tailed)		.025	.049	.002

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Pola ekspresi intra sel di otot gastroknemius	.065	2	24	.937
Pola ekspresi ekstra sel di otot gastroknemius	.686	2	24	.513
Pola ekspresi intra sel & ekstra sel di otot gastroknemius	1.763	2	24	.193

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Pola ekspresi intra sel di otot gastroknemius	Between Groups	1942.296	2	971.148	385.603	.000
	Within Groups	60.444	24	2.519		
	Total	2002.741	26			
Pola ekspresi ekstra sel di otot gastroknemius	Between Groups	17111.630	2	8555.815	3.397E3	.000
	Within Groups	60.444	24	2.519		
	Total	17172.074	26			
Pola ekspresi intra sel & ekstra sel di otot gastroknemius	Between Groups	9976.963	2	4988.481	839.184	.000
	Within Groups	142.667	24	5.944		
	Total	10119.630	26			

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Kelompok usia	(J) Kelompok usia	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Pola ekspresi intra sel di otot gastrokne mius	1-4 hari	3-4 bulan	2.222*	.748	.007	.68	3.77
		12-16 bln	19.000*	.748	.000	17.46	20.54
	3-4 bulan	1-4 hari	-2.222*	.748	.007	-3.77	-.68
		12-16 bln	16.778*	.748	.000	15.23	18.32
		12-16 bln	1-4 hari	-19.000*	.748	.000	-20.54
		3-4 bulan	-16.778*	.748	.000	-18.32	-15.23
Pola ekspresi ekstra sel di otot gastrokne mius	1-4 hari	3-4 bulan	-43.000*	.748	.000	-44.54	-41.46
		12-16 bln	-59.778*	.748	.000	-61.32	-58.23
	3-4 bulan	1-4 hari	43.000*	.748	.000	41.46	44.54
		12-16 bln	-16.778*	.748	.000	-18.32	-15.23
		12-16 bln	1-4 hari	59.778*	.748	.000	58.23
		3-4 bulan	16.778*	.748	.000	15.23	18.32
Pola ekspresi intra sel & ekstra sel di otot gastrokne mius	1-4 hari	3-4 bulan	40.778*	1.149	.000	38.41	43.15
		12-16 bln	40.778*	1.149	.000	38.41	43.15
	3-4 bulan	1-4 hari	-40.778*	1.149	.000	-43.15	-38.41
		12-16 bln	.000	1.149	1.000	-2.37	2.37
		12-16 bln	1-4 hari	-40.778*	1.149	.000	-43.15
		3-4 bulan	.000	1.149	1.000	-2.37	2.37

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Pola ekspresi intra sel di otot soleus	Pola ekspresi ekstra sel di otot soleus	Pola ekspresi intra sel & ekstra sel di otot soleus
N		27	27	27
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	19.41	37.15	43.81
	Std. Deviation	11.396	26.490	17.341
Most Extreme Differences	Absolute	.257	.239	.304
	Positive	.214	.228	.304
	Negative	-.257	-.239	-.211
Kolmogorov-Smirnov Z		1.334	1.244	1.577
Asymp. Sig. (2-tailed)		.057	.091	.014

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Pola ekspresi intra sel di otot soleus	.538	2	24	.591
Pola ekspresi ekstra sel di otot soleus	3.253	2	24	.056
Pola ekspresi intra sel & ekstra sel di otot soleus	1.821	2	24	.184

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Pola ekspresi intra sel di otot soleus	Between Groups	3339.185	2	1669.593	1073.310	.000
	Within Groups	37.333	24	1.556		
	Total	3376.519	26			
Pola ekspresi ekstra sel di otot soleus	Between Groups	18168.963	2	9084.481	2852.105	.000
	Within Groups	76.444	24	3.185		
	Total	18245.407	26			
Pola ekspresi intra sel & ekstra sel di otot soleus	Between Groups	7611.630	2	3805.815	442.441	.000
	Within Groups	206.444	24	8.602		
	Total	7818.074	26			

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Kelompok usia	(J) Kelompok usia	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Pola ekspresi intra sel di otot soleus	1-4 hari	3-4 bulan	6.333*	.588	.000	5.12	7.55
		12-16 bln	26.111*	.588	.000	24.90	27.32
	3-4 bulan	1-4 hari	-6.333*	.588	.000	-7.55	-5.12
		12-16 bln	19.778*	.588	.000	18.56	20.99
	12-16 bln	1-4 hari	-26.111*	.588	.000	-27.32	-24.90
		3-4 bulan	-19.778*	.588	.000	-20.99	-18.56
Pola ekspresi ekstra sel di otot soleus	1-4 hari	3-4 bulan	-42.667*	.841	.000	-44.40	-40.93
		12-16 bln	-62.111*	.841	.000	-63.85	-60.37
	3-4 bulan	1-4 hari	42.667*	.841	.000	40.93	44.40
		12-16 bln	-19.444*	.841	.000	-21.18	-17.71
	12-16 bln	1-4 hari	62.111*	.841	.000	60.37	63.85
		3-4 bulan	19.444*	.841	.000	17.71	21.18
Pola ekspresi intra sel & ekstra sel di otot soleus	1-4 hari	3-4 bulan	35.222*	1.383	.000	32.37	38.08
		12-16 bln	36.000*	1.383	.000	33.15	38.85
	3-4 bulan	1-4 hari	-35.222*	1.383	.000	-38.08	-32.37
		12-16 bln	.778	1.383	.579	-2.08	3.63
	12-16 bln	1-4 hari	-36.000*	1.383	.000	-38.85	-33.15
		3-4 bulan	-.778	1.383	.579	-3.63	2.08

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

PERUBAHAN EKSPRESI TENASIN-C PADA OTOT GASTROKNEMIUS DAN SOLEUS TIKUS USIA 1 HARI, 3 BULAN, DAN 12 BULAN

Sidharta VM
Departemen Histologi FK Unika Atma Jaya

ABSTRAK

Latar belakang: Otot rangka adalah jaringan yang dinamis. Proses perkembangan dan regenerasinya dipengaruhi oleh berbagai faktor pertumbuhan, antara lain tenasin-C. Tenasin-C adalah suatu glikoprotein heksabronion matriks ekstra sel yang mempunyai subunit *EGF-like*. Tenasin-C berfungsi sebagai regulator berbagai fungsi sel. Tenasin-C berperan pada miogenesis, angiogenesis, dan reinervasi pada regenerasi otot rangka. Penelitian ini bertujuan melihat ekspresi tenasin-C pada jaringan otot rangka berkaitan dengan proses perkembangan. Dihipotesiskan bahwa seiring bertambahnya usia akan terjadi penurunan ekspresi tenasin-C pada otot rangka.

Metode: Desain penelitian ini adalah perbandingan potong lintang dengan subyek tikus Sprague-Dawley jantan usia 1-4 hari, 3-4 bulan, dan 12-16 bulan. Sediaan mikroskopik diwarnai dengan hematoksilin-eosin dan imunohistokimia tenasin-C. Fotomikrograf dianalisis dengan Digimizer Image Analyzer. Analisis imunoreaktivitas TNC dilakukan berdasarkan intensitas pewarnaan dan pola ekspresi.

Hasil: Ekspresi TNC ditemukan pada otot rangka semua kelompok umur. Ekspresi kuat terhadap TNC paling sering ditemukan di kelompok usia 1-4 hari. Ekspresi negatif dan ekspresi lemah paling sering ditemukan di kelompok usia 12-16 bulan. Pola ekspresi tenasin-C adalah positif intra sel (sitoplasmik), ekstra sel (membranous), dan kombinasi (intra dan ekstra sel).

Kesimpulan: Ekspresi TNC didapatkan pada semua kelompok usia, terutama kelompok usia 1-4 hari. Pada pertambahan usia otot rangka akan terjadi penurunan dan perubahan pola ekspresi TNC.

Kata kunci: perkembangan otot rangka, jumlah serat, diameter serat, tenasin-C

ABSTRACT

Background: Skeletal muscle is a dynamic tissue. Its development and regeneration processes are influenced by various growth factors. Amongst those factors is tenascin-C (TNC). TNC is one of the extracellular matrix glycoprotein with EGF-like subunit. TNC acts as regulator for several cell functions. TNC plays a vital role in skeletal muscle remodeling, angiogenesis, and reinnervation. This study aims to describe TNC expression in skeletal muscle related with developmental process. The preferred hypothesis is with increasing age, there

will be decreasing TNC expression and increment of skeletal muscle fiber number and diameter.

Methods: This is a comparative cross-sectional study. Subjects are male Sprague-Dawley rats, divided into 3 age groups: 1-4 days, 3-4 months, and 12-16 months. Microscopic specimens were made and stained with hematoxylin-eosin and TNC immunohistochemistry. Microphotographs were analysed using Digimizer Image Analyzer. Immunoreactivity of TNC was classified based on staining intensity and expression pattern.

Result: TNC expression was positive in all age groups. Strong TNC expression was found in 1-4 day-old group. Negative and weak expressions were found mostly in 12-16 month-old group. Immunoreactivity was found intracellular (cytoplasmic), extracellular (membranous), and both (intra and extracellular).

Conclusion: TNC expression was positive in all age groups, especially group 1-4 day-old. But with increasing age, the expression became less intense and there is a change in the pattern of expression.

Keyword: skeletal muscle development, fiber number, fiber diameter, tenascin-C

Pendahuluan

Otot rangka berperan sangat penting dalam kehidupan kita sehari-hari. Aktivitas kita sehari-hari, mulai dari gerakan motorik kasar seperti berdiri, menyeimbangkan tubuh dan berlari sampai gerakan motorik halus seperti menulis, melukis dan menjahit, tergantung pada otot rangka. Bahkan gerakan yang vital untuk kehidupan pun seperti bernafas dan mengunyah makanan juga tergantung pada otot rangka. Pemakaian otot rangka akan menyebabkan pengusangan, yang bila tidak diperbaiki akan mengakibatkan gangguan fungsi.

Sebelumnya serat otot rangka mamalia dewasa dikatakan sebagai jaringan yang telah terdiferensiasi penuh. Pertumbuhan jaringan otot rangka dianggap hanya disebabkan oleh hipertrofi.¹⁻³ Sekarang penelitian menunjukkan bahwa hiperplasia juga memegang peranan.^{2,3} Salah satu mekanisme hiperplasia melibatkan sel satelit.^{2,6-9} Berkat sel satelit ini pula, bila terjadi kerusakan serat otot rangka dapat memperbaiki diri sehingga tidak terjadi pengurangan massa otot. Proses pertumbuhan otot dan rangsangan pada otot, misalnya olah raga atau kerusakan, dapat mengaktifkan sel satelit.⁶

Proses pertumbuhan dan regenerasi otot rangka dipengaruhi oleh berbagai faktor pertumbuhan dan serangkaian peristiwa seluler, yang meregulasi sel satelit. Beberapa faktor telah diteliti perannya dalam regulasi proliferasi, diferensiasi, dan motilitas sel satelit. Tenasin-C merupakan salah satu molekul di matriks ekstrasel otot rangka yang diduga memiliki beberapa aksi antara lain meningkatkan kinerja sel satelit dalam proses regenerasi otot rangka, angiogenesis dan reinervasi taut neuromuskular.⁹⁻¹²

Tenasin-C (TNC) adalah suatu glikoprotein heksabronon pada matriks ekstrasel yang antara subunit-subunitnya disatukan oleh ikatan disulfida.⁸⁻¹¹ Salah satu subunitnya mempunyai aktivitas mirip *epidermal growth factor* (EGF-like) dengan sifat dapat merangsang pertumbuhan.¹² Di antara molekul matriks ekstrasel, TNC dikenal sebagai regulator berbagai fungsi sel selama

embriogenesis, penyembuhan luka atau perkembangan ke arah kanker.^{11,14} TNC telah digunakan sebagai penanda lingkungan mikro sel punca neuron atau sel progenitor saraf di ventrikel otak/zona hipokampus.¹⁵ Ekspresi TNC bisa dilihat dengan cara imunohistokimia dan dinilai secara semikuantitatif dengan estimasi visual. Beberapa penelitian telah menunjukkan adanya korelasi antara ekspresi TNC dengan regenerasi pembuluh darah (angiogenesis) dan saraf.⁷⁻¹⁰

Ekspresi TNC pada jaringan muskuloskeletal normal terbatas, hanya di sekitar pembuluh-pembuluh darah dalam jaringan otot. Ekspresi TNC akan meningkat selama masa embriogenesis, proses regenerasi, dan penyembuhan. Bila terjadi kerusakan otot, ekspresi TNC akan meningkat pada daerah kerusakan. TNC diduga berfungsi menstimulasi proliferasi sel, kemungkinan sel satelit, dan juga membantu proses regenerasi otot. Pemahaman mengenai struktur dan fungsi TNC dapat bermanfaat untuk terapi kerusakan otot di masa depan melalui pemberian TNC secara eksogen.^{7,8,21}

Perubahan ekspresi TNC pada otot gastroknemius dan soleus berkaitan dengan proses perkembangan belum pernah diteliti sebelumnya.

Bahan dan Metode

Hewan coba

Subyek penelitian adalah 27 ekor tikus putih jantan galur Sprague-Dawley, dibagi dalam tiga kelompok usia, yaitu 1-4 hari, 3-4 bulan, dan 12-16 bulan. Semua tikus didapat dari Subyek penelitian diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Puslitbang Biomedis dan Farmasi DepKes RI. Kaji etik dikeluarkan oleh Litbangkes DepKes RI.

Pewarnaan Imunohistokimia

Jaringan dipotong dengan ketebalan 4 μm , diletakkan di atas kaca obyektif yang telah dilapisi *silane*. Setelah proses deparafinisasi dan rehidrasi bertahap, sediaan diinkubasi dengan 0,5 % H_2O_2 dalam metanol untuk menghentikan aktivitas peroksidase endogen. Untuk memulihkan epitop (*antigen retrieval*), sediaan diinkubasi dalam dapar asam sitrat (pH 6,0) dan dipanaskan dalam oven gelombang mikro. Bloking aktivitas non spesifik dengan *blocking serum* (*donkey serum*, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Antibodi primer *goat polyclonal anti-human Tenascin C* (N-19/sc-9871, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diencerkan 1:200 dengan *blocking serum*. Inkubasi sediaan dengan antibodi primer dalam kotak lembab semalaman pada suhu 4°C. Keesokan harinya sediaan diinkubasi dengan antibodi sekunder (*biotinylated secondary antibody*, kit *ABC Staining System*, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Kemudian dilanjutkan inkubasi dengan reagen enzim AB (*avidin and biotinylated horseradish peroxidase*, kit *ABC Staining System*, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Kemudian TNC divisualisasikan dengan cara inkubasi dalam DAB (substrat peroksidase, dari kit *ABC Staining System*, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). *Counterstain* dengan hematoksin Mayer.

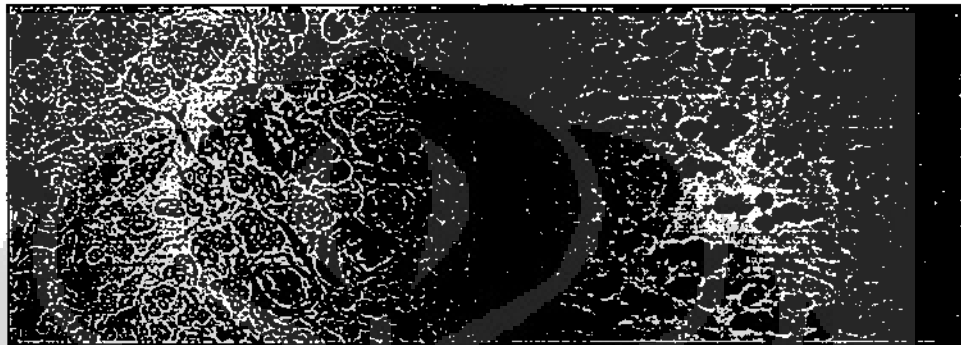
Pengambilan Data

Penilaian dilakukan berdasarkan intensitas pewarnaan imunohistokimia TNC dan pola ekspresinya. Skor intensitas berdasarkan IHC World Scoring: 1 =

weak staining/lemah, 2 = *moderate staining*/sedang, 3 = *strong staining*/kuat, 0 = negatif. Dari 100 sel yang menunjukkan ekspresi positif dilihat pola ekspresinya, dikelompokkan menjadi positif intra sel, positif ekstra sel, atau positif kombinasi (intra dan ekstra sel).

Hasil

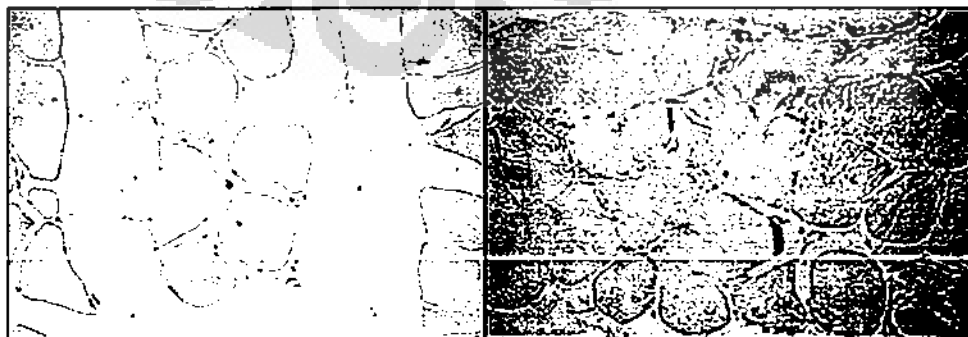
Gambar 1. Kontrol negatif dan hasil pewarnaan imunohistokimia TNC otot rangka tikus usia 1-4 hari



Gambar 2. Kontrol negatif dan hasil pewarnaan imunohistokimia TNC otot rangka tikus usia 3-4 bulan



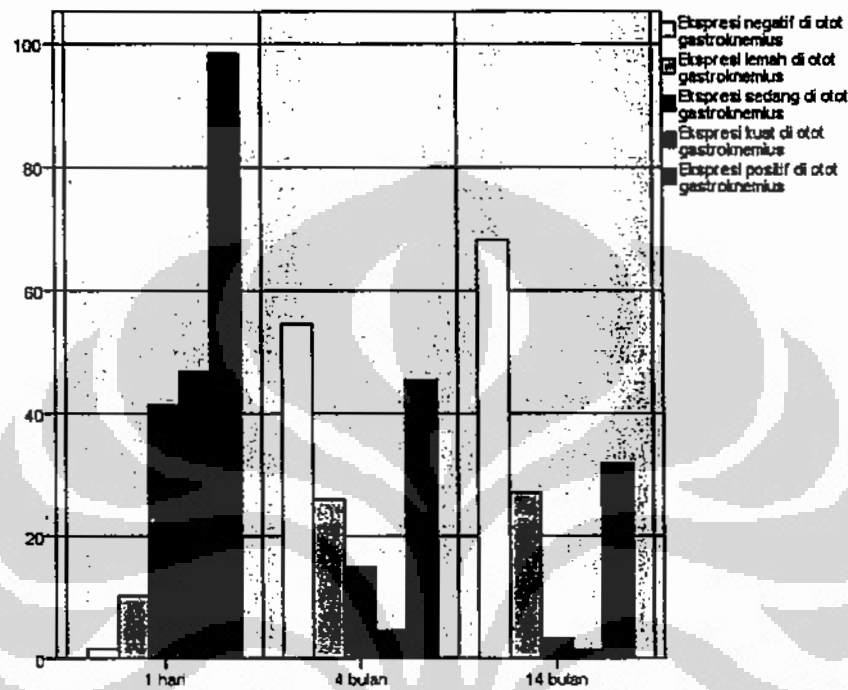
Gambar 3. Kontrol negatif dan hasil pewarnaan imunohistokimia TNC otot rangka tikus 12-16 bulan



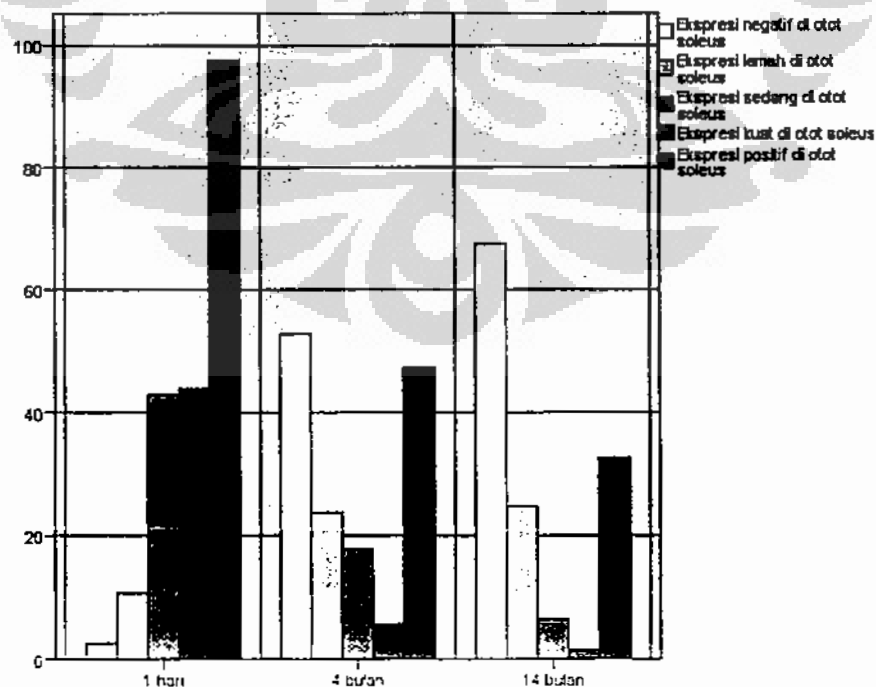
Hasil penelitian ini menunjukkan serat otot rangka pada semua subyek positif untuk pewarnaan TNC. Ekspresi kuat (skor 3) terhadap TNC paling sering

ditemukan di kelompok usia 1-4 hari (gastroknemius = $46,89 \pm 3,1$; soleus = $43,89 \pm 2,6$). Ekspresi lemah (skor 1) paling sering ditemukan di kelompok usia 12-16 bulan (gastroknemius = $26,00 \pm 2,6$; soleus = $24,67 \pm 1,0$).

Grafik 1. Kisaran jumlah serat otot gastroknemius berdasarkan kelompok usia dan intensitas ekspresi TNC

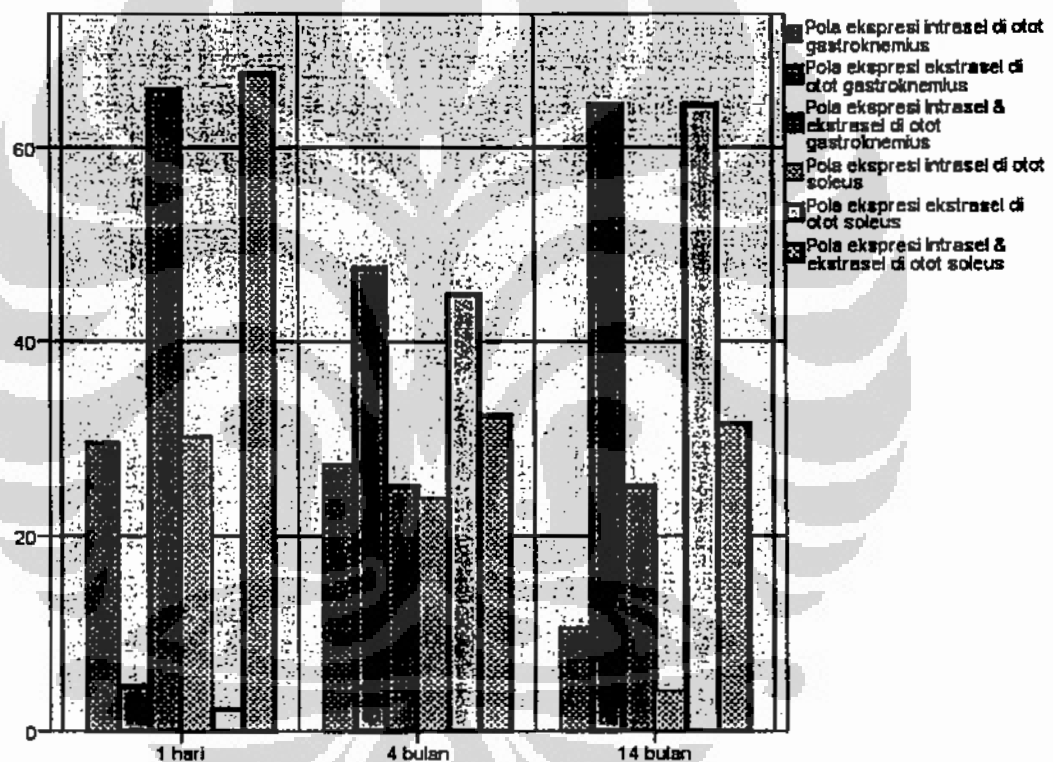


Grafik 2. Kisaran jumlah serat otot soleus berdasarkan kelompok usia dan intensitas ekspresi TNC



Hasil positif TNC dibagi lagi berdasarkan pola ekspresinya menjadi positif intra sel, positif ekstra sel dan kombinasi. Pola ekspresi TNC yang sering ditemukan di kelompok usia 1-4 hari adalah pola kombinasi (gastroknemius = $65,89 \pm 2,6$; soleus = $67,56 \pm 2,1$) dan intra sel (gastroknemius = $29,56 \pm 1,5$; soleus = $30,22 \pm 1,4$). Pola ekspresi TNC ekstra sel lebih sering ditemukan di kelompok usia 3-4 bulan (gastroknemius = $47,56 \pm 1,8$; soleus = $44,89 \pm 2,03$) dan 12-16 bulan (gastroknemius = $64,33 \pm 1,6$; soleus = $64,33 \pm 2,1$) dibandingkan kelompok usia 1-4 hari (gastroknemius = $4,56 \pm 1,3$; soleus = $2,22 \pm 0,97$). Ekspresi TNC negatif paling sering ditemukan di kelompok 12-16 bulan (gastroknemius = $68,22 \pm 1,4$; soleus = $67,44 \pm 1,8$).

Grafik 3. Kisaran jumlah serat otot gastroknemius dan soleus berdasarkan kelompok usia dan pola ekspresi TNC



Diskusi

Ekspresi TNC ditemukan pada otot gastroknemius dan soleus tikus kelompok usia 1-4 hari, 3-4 bulan, dan 12-16 bulan. Hal ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa otot rangka dewasa normal tidak mengekspresikan TNC. Hasil penelitian ini membuka wawasan baru tentang ekspresi TNC pada otot rangka berkaitan dengan proses perkembangan.

Pewarnaan imunohistokimia menunjukkan pola ekspresi TNC di intra sel, ekstra sel, dan kombinasi keduanya. Lokasi ekspresi secara imunohistokimia menggambarkan keberadaan molekul TNC di dalam sel saat disintesis di dalam sitoplasma, dan di luar sel ketika aktif bekerja sebagai protein matriks ekstrasel. Lokasi ekspresi TNC di intra dan ekstra sel (kombinasi) menggambarkan keadaan serat otot rangka yang aktif mensintesis dan mentranspor TNC ke matriks

ekstrasel. Selama ini diketahui TNC merupakan molekul matriks ekstrasel yang disintesis oleh sel fibroblas. Ternyata TNC juga diekspresikan oleh serat otot rangka. Hal ini menguatkan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa

Sato dkk dalam penelitiannya mendeteksi mRNA TNC (600 bp) pada jaringan otot yang sedang berkembang, dengan kadar yang menurun seiring bertambahnya usia. Berdasarkan penelitian Flück dkk, pemberian beban mekanik dapat menginduksi ekspresi TNC di otot rangka. Sintesis protein TNC berlangsung di dalam sel, kemudian ditranspor keluar sel.

Dari penelitian ini diketahui bahwa ekspresi kombinasi dan intra sel lebih banyak ditemukan pada kelompok usia 1-4 hari, sedangkan ekspresi ekstra sel lebih banyak ditemukan pada kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan. Diduga otot rangka tikus kelompok usia 1-4 hari aktif mensintesis TNC dan sebagian ditranspor ke matriks ekstrasel, namun lebih banyak yang disimpan di dalam sitoplasma. Sedangkan pada otot rangka tikus kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan diduga kebutuhan akan TNC untuk remodeling dan regenerasi otot meningkat sehingga TNC lebih banyak yang ditranspor ke matriks ekstrasel. Dugaan lainnya adalah pada otot rangka tikus kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan, sel yang lebih aktif mensintesis TNC adalah sel fibroblas. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian ini bahwa serat otot tikus kelompok usia 3-4 bulan dan 12-16 bulan lebih banyak yang negatif mengekspresikan TNC.

Penelitian ini membuktikan bahwa seiring dengan penambahan usia, terjadi penurunan ekspresi TNC, baik dalam jumlah serat otot rangka yang positif mengekspresikan TNC maupun intensitas pewarnaan TNC. Selain itu juga terdapat perbedaan pola ekspresi TNC di otot rangka usia 1-4 hari, usia 3-4 bulan, dan 12-16 bulan.

Dari hal-hal ini kita memperkirakan bahwa pemberian TNC eksogen dapat berperan sebagai agen anti penuaan (apoptosis) serat otot rangka. Pemanfaatan TNC sebagai penanda lingkungan mikro sel punca otot rangka sementara ini masih berupa pemikiran, karena daerah matriks ekstrasel tidak tervisualisasi pada seluruh sajian histologi otot rangka.

Kesimpulan

Ekspresi TNC ditemukan di otot rangka tikus semua kelompok usia. Seiring bertambahnya usia akan terjadi penurunan ekspresi dan perubahan pola ekspresi TNC di otot rangka.

Referensi

1. Fawcett DW. Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology. 12th ed. New York: Chapman and Hall; 1994.
2. Le Grand F, Rudnicki MA. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 December; 19(6):628-633.
3. Hurme T, Kalimo H. Adhesion in skeletal muscle during regeneration. *Muscle Nerve.* 1992 Apr; 15(4):482-9.
4. Jones FS, Jones PL. The Tenascin Family of ECM Glycoproteins: Structure, Function, and Regulation During Embryonic Development and Tissue Remodeling. *Dev Dyn* 2000; 218:235-59.

5. Cifuentes-Diaz C, Faille L, Goudou D, Schachner M, Rieger F, Angaut-Petit D. Abnormal reinnervation of skeletal muscle in a tenascin-C-deficient mouse. *Journal of Neuroscience Research* 2001; 67(1):93-99.
6. Wallner K, Li C, Fishbein MC, Shah PK, Sharifi BG. Arterialization of Human Vein Grafts Is Associated With Tenascin-C Expression. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:871-5.
7. Jarvinen T, Jozsa L, Kannus P, et al. Mechanical loading regulates the expression of tenascin-c in the myotendonous junction and tendon but does not induce de novo synthesis in skeletal muscle. *J of Cell Science* 2003; 116:857-866.
8. Swindle CS, Tran KT, Johnson TD, Banerjee P, Mayes AM, Griffith L, et al. Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. *The Journal of Cell Biology*, July 23, 2001; 154(2):459-68.
9. Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 1986; 47: 131-139.
10. Järvinen TAH, Jozsa L, Kannus P, Järvinen TLN, Kvist M, Hurme T, et al. Mechanical loading regulates tenascin-C expression in the osteotendinous Junction. *Journal of Cell Science* 1999; 112:3157-66.
11. Yanagisawa M, Yu RK. The Expression and Functions of Glycoconjugates in Neural Stem Cells. *Glycobiology* 2007.
12. Wang LC, Kernell D. Quantification of fibre type regionalisation: an analysis of lower hindlimb muscles in the rat. *J. Anat.* 2001; 198:295-308.
13. Timson BF, Dudenhoefter GA. Skeletal muscle fibre number in the rat from youth to adulthood. *J. Anat.* 1990; 173, 33-36.
14. Williams GN, Higgins MJ, Lewek MD. Aging skeletal muscle: physiologic changes and the effects of training. *Phys Ther.* 2002;82:62-68.
15. Nicks DK, Beneke WM, Key RM, Timson BF. Muscle fibre size and number following immobilization atrophy. *J. Anat.* 1989; 163, pp. 1-5 1.
16. Siu PM, Pistilli EE, and Always SE. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: R1015-R1026.
17. Flück M, Mund S, Schittny J, Durieux AC, Giraud MN. Tenascin-C-deficiency accelerates mechano- and age-dependent skeletal muscle atrophy. *The FASEB Journal.* 2007; 21:lb537.
18. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84:209-238.
19. Zagzag D, Shiff B, Jallo GI, Greco MA, Blanco Cy, Cohen H et al. Tenascin-C Promotes Microvascular Cell Migration and Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase. *Cancer Research* May 1, 2002; 62:2660-8.
20. Nishio T, Kawaguchi S, Iseda T, Kawasaki T, Hase T. Secretion of tenascin-C by cultured astrocytes: regulation of cell proliferation and process elongation. *Brain Research* 14 November 2003; 990(1-2):129-40.
21. Tablin F, Rabier MJ, Walker NJ, Velasco VM, Field CL, Leven RM. Tenascin-C is Synthesised and Secreted by Megakaryocytes, whose Adherence to Intact Tenascin is Mediated by the Integrin Subunit β 1. *Comparative Haematology International* (1998) 8:142-9.
22. Gatchalian CL, Schachner M, Sancs JR. Fibroblasts that Proliferate Near Denervated Synaptic Sites in Skeletal Muscle Synthesize the Adhesive Molecules Tenascin(J1), N-CAM, Fibronectin, and a Heparan Sulfate Proteoglycan. *The Journal of Cell Biology*, May 1989; 108:1873-90.
23. Latijnhouwers M, Bergers M, Ponc M, Dijkman H, Andriessen M, Schalkwijk J. Human Epidermal Keratinocytes Are a Source of Tenascin-C during Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 1997; 108:776-83.

24. Zagzag D, Friedlander DR, Dosik J, Chikramane S, Chan W, Greco MA et al. Tenascin-C expression by angiogenic vessels in human astrocytomas and by human brain endothelial cells in vitro. *Cancer Res.* 1996 Jan 1; 56(1):182-9.
25. Soini Y, Kamel D, Apaja-Sarkkinen M, Virtanen I, Lehto V-P. Tenascin immunoreactivity in normal and pathological bone marrow. *Clin Pathol* 1993; 46:218-21.
26. De Wever O, Nguyen QD, Van Hoorde L, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, et al. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J.* 2004 Jun; 18(9):1016-8.
27. Introduction to Immunohistochemistry. Diunduh dari halaman utama <http://www.ihcworld.com/introduction> pada tanggal 15 September 2008.
28. Hanekamp EE, Gielen SCJP, Smid-Koopman E, Kühne LCM, de Ruiten PE, Chadha-Ajwani S et al. Consequences of Loss of Progesterone Receptor Expression in Development of Invasive Endometrial Cancer. *Clinical Cancer Research* September 15, 2003; 9:4190-9.
29. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The Role of Stem Cells in Skeletal and Cardiac Muscle Repair. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2002; 50(5): 589-610.
30. Sato I, Ueno R, Mikami A, Kunimoto S, Sunohara M. Distribution of Tenascin-C and -X in Rat TMJ Development. *Okajimas Folia Anatomica Japonica* 2003; 80(2.3):57-62.
31. Flück M, Tunç-Civelek V, Chiquet M. Rapid and reciprocal regulation of tenascin-C and tenascin-Y expression by loading of skeletal muscle. *Journal of Cell Science* 2000; 113:3583-91.

RIWAYAT HIDUP



1. Nama : Veronika Maria Sidharta
2. NPM : 0606000251
3. Tempat / Tanggal Lahir : Malang / 2 November 1975
4. Agama : Katolik Roma
5. Alamat Rumah : Kayu Putih Tengah no. 61
RT/RW 003/07,
Kelurahan Pulo Gadung
Jakarta Timur – 13260
6. Alamat Kerja : Departemen Histologi FK Unika Atma Jaya
Kompleks RS Unika Atma Jaya
Jl. Pluit Raya no. 2, Jakarta Utara - 14440
7. Nama Suami : Juergen Gunawan
8. Nama Anak : Gregorius Wilhelm Gunawan
9. Orang Tua : Andreas Sidharta & Retno Susilo
10. Riwayat Pendidikan :
 - i. SD Don Bosco II – Pulomas (1982-1988)
 - ii. SMP Don Bosco II – Pulomas (1988-1991)
 - iii. SMA Fons Vitae I – Matraman (1991-1994)
 - iv. Fakultas Kedokteran Unika Atma Jaya (1994-2002)
11. Riwaya Pekerjaan :
 - i. Dokter PTT di Kab. Kutai Barat – Kalimantan Timur (2003 – 2005)
 - ii. Staf pengajar Departemen Histologi FKUAJ (2005 – sekarang)
12. Sumber dana penelitian tesis PMIB FKUI :
 - i. Beasiswa PTB Unika Atma Jaya
 - ii. Dana pribadi

Jakarta, 19 Juni 2009


Veronika Maria Sidharta