

## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Kadar Vitamin D Serum Pada Pasien Lupus Eritematosus Sistemik

Pada penelitian ini perhitungan rata-rata vitamin D dari 22 sampel pasien LES adalah 21ng/ml. Hasil ini lebih rendah secara signifikan dibandingkan dengan rata-rata 11 sampel kelompok kontrol yaitu 31,6 ng/ml dengan nilai signifikansi ( $p\text{-value} < 0.05$ ) 0.000 yang berarti sangat signifikan. Hal ini sepadan dengan penelitian - penelitian sebelumnya yang menyatakan adanya hubungan antara timbulnya penyakit autoimun dengan defisiensi vitamin D (Adams dan Hewison, 2008). Berbagai hasil penelitian menyatakan terdapatnya persentase tinggi penderita LES di negara dengan 4 musim yang mengalami defisiensi vitamin D (Kuhn, 2009). Pada studi yang dilakukan Ruiz-Iratorza *et al.* tahun 2008 didapatkan bahwa defisiensi dan insufisiensi vitamin D umum terjadi pada pasien LES. Kadar vitamin D serum (25-hydroxyvitamin D) didapatkan lebih rendah pada pasien LES pediatri maupun dewasa dibanding kontrol sehat (Paracchi *et al.*, 2014). Hasil penelitian Handono 2012 juga memperoleh hasil yang serupa, di mana sebagian besar pasien LES di Malang mempunyai kadar vitamin D yang rendah (71%). Dikatakan defisiensi vitamin D apabila kadar vitamin D serum yang terukur  $\leq 20$  ng/ml, insufisiensi bila kadar 21 - 29 ng/ml, dan sufisien atau normo vitamin D bila kadar  $\geq 30$  ng/ml (Holick, 2007).

Menurut Comak *et al* (2014), prevalensi defisiensi vitamin D pasien LES lebih tinggi dibandingkan dengan populasi umum karena mempunyai faktor risiko multipel untuk defisiensi vitamin D, yaitu penggunaan kortikosteroid jangka panjang, tingginya persentase keterlibatan ginjal, penggunaan

*hydroxychloroquine*, antibodi anti-vitamin D, dan penghindaran diri dari paparan sinar matahari. Sedangkan menurut Schoindre *et al* (2014) beberapa faktor yang terkait dengan rendahnya kadar vitamin D pada pasien LES adalah jenis kelamin perempuan dan tingginya aktivitas penyakit. Jenis kelamin perempuan merupakan faktor risiko klasik dari rendahnya kadar vitamin D pada populasi umum dan pasien LES. Hal ini dapat dijelaskan dengan perbedaan aktivitas di luar ruangan atau pakaian, area permukaan tubuh bagian bawah, dan perbedaan *androgen-related* pada tingkat protein pengikat vitamin D pada produksi prekursor oleh kulit atau 25-hydroxylation oleh liver. Korelasi negatif antara defisiensi vitamin D dan tingginya aktivitas penyakit juga didapatkan pada studi yang dilakukan Comak *et al* 2014 pada pasien LES pediatri. Selain itu sejumlah besar studi cross-sectional mengenai status vitamin D dan pasien LES dewasa juga menunjukkan hal yang sama. Di sisi lain, menurut Kalim *et al* 2014, defisiensi vitamin D tidak berhubungan dengan keparahan penyakit LES, namun berhubungan dengan peningkatan derajat kelelahan. Pada studi lain yang dilakukan oleh Robinson *et al* tahun 2014, ditemukan bahwa defisiensi vitamin D umum terjadi pada pasien LES pediatri dan secara independen berhubungan dengan peningkatan marker inflamasi yang memprediksikan risiko penyakit kardiovaskular yaitu hsCRP. Meskipun hubungan ini tidak membuktikan penyebabnya, hal ini adalah sesuatu yang baru pada populasi pasien LES pediatri dan memberi kesan bahwa defisiensi vitamin D dapat berperan pada memuncaknya inflamasi dan risiko kardiovaskular pada populasi yang diteliti.

Pasien LES harus menghindari sinar matahari karena ruam fotosensitifitas dan berpotensi memperparah penyakit (Comak *et al.*, 2014). Kurangnya paparan sinar matahari merupakan penyebab utama defisiensi

vitamin D pada ras Kaukasia, karena sekitar 80% vitamin D dalam tubuh berasal dari previtamin D yang diproduksi di kulit yang diinduksi oleh sinar ultra violet B (Ruiz-Irastorza *et al.*, 2008). Jadi, suplementasi vitamin D sangat diperlukan untuk pasien LES. Pada studi yang dilakukan Comak *et al* 2014, sebanyak 37,5% pasien dijadikan subjek penelitian menggunakan suplemen vitamin D, hasilnya terdapat perbedaan kadar level vitamin D serum dan skor SLEDAI yang signifikan pada pasien tersebut dibanding pasien yang tidak menggunakan suplemen vitamin D.

## **6.2 Jumlah *Low-Density Granulocytes* Pada Pasien Lupus Eritematosus Sistemik**

Pada penelitian ini rata-rata jumlah LDGs pada 22 pasien LES adalah 39.15%. Hasil ini lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan rata-rata 11 sampel kelompok kontrol yaitu 14.96% dengan nilai signifikansi ( $p$ -value < 0.05) 0.002 yang berarti sangat signifikan. Hasil ini sepadan dengan yang ditemukan pada penelitian lain. Pada tahun 2010, Denny *et al* mengonfirmasi dalam studinya bahwa semua pasien LES dewasa yang diperiksa mempunyai LDGs pada fraksi PBMCnya dengan prevalensi keterlibatan kulit dan atau vaskulitis meningkat pada pasien yang jumlah LDGsnya lebih tinggi di perifer. Selain itu, Analisis *microarray* sel mononuklear darah pada pasien LES pediatri yang dilakukan oleh Bennet *et al* tahun 2003 menunjukkan adanya ekspresi gen spesifik neutrofil dalam jumlah tinggi yang merupakan akibat dari adanya neutrofil imatur pada fraksi PBMC pasien tersebut.

Merupakan sesuatu yang memungkinkan bahwa sitokin, autoAbs (*autoantibodies*) dan atau kompleks imun yang ada pada pasien LES dapat

mengubah *bone marrow niche* atau meningkatkan pelepasan granulosit imatur. Namun masih belum jelas apakah ekspos granulosit sumsum oleh sitokin dan atau kompleks imun dapat mengubah morfologinya dan atau ekspresi gennya. Selain itu, mekanisme alternatif lain terbentuknya LDGs adalah gangguan pertumbuhan granulosit yang ditandai dengan peningkatan regulasi *granulopoiesis-related genes* yang berhubungan dengan aktifitas penyakit. Beberapa gen yang regulasinya meningkat tersebut ditemukan di tahap awal perkembangan neutrofil. Meskipun karakterisasi utama LDGs menunjukkan bahwa LDGs merupakan granulosit imatur, berdasarkan nukleusnya yang berlobus atau oval, ekspresi molekul permukaan pada LDGs menunjukkan bentuk yang lebih konsisten dengan bagian pertumbuhan yang matur sempurna (Carmona-rivera dan Kaplan, 2013; Singh *et al.*, 2014).

Sementara asal dan peran LDGs perlu diperinci secara penuh, ada bukti bahwa sel-sel ini mungkin akan berperan dalam patogenesis lupus dan perkembangan kerusakan akhir organ melalui respon proinflamasi tinggi, perubahan kapasitas fagositik, peningkatan kemampuan untuk menyintesis interferon tipe 1, dan untuk membunuh sel endotel. Selanjutnya, sel-sel ini siap membentuk *neutrophil extracellular traps* (NETs), yaitu sebuah fenomena yang dapat meningkatkan eksternalisasi autoantigen dan kerusakan organ (Carmona-rivera dan Kaplan, 2013). LDGs juga mungkin memainkan peran ganda penting dalam perkembangan penyakit kardiovaskular prematur pada LES yaitu dengan memediasi peningkatan kerusakan vaskular dan menghambat perbaikan pembuluh darah secara simultan (Denny *et al.*, 2010).

Selain memediasi peningkatan respon proinflamasi, LDGs pada pasien dewasa juga meningkatkan respon sitotoksik dibandingkan autolog neutrofil

densitas normal. LDGs ini siap menginduksi kematian sel endotelial dan secara spontan membentuk *neutrofil extracellular traps* (NETs) (Singh *et al.*, 2014).

NETs dicirikan sebagai serat kromatin yang berhubungan dengan protein granular yang dilepaskan ke ruang ekstraseluler dengan tujuan untuk membunuh dan membuat mikroba yang menginvasi tidak bergerak selama proses kematian sel yang disebut NETosis. Sebagai tambahan dari peran antimikrobialnya, bukti terbaru menunjukkan bahwa NETs dapat menginduksi kerusakan endotelial dan membuka molekul penstimulasi imun yang poten. Berdasarkan peran potensial dari neutrofil *netting* (menjaring) pada pengeluaran autoantigen dan pengaktifan sistem imun adaptif, Carmona-rivera dan Kaplan mengusulkan bahwa LDGs, yang paling sedikit melalui sebuah efek yang berhubungan dengan NET, mungkin berperan penting dalam patogenesis LES dan kerusakan organ terkait (Carmona-rivera dan Kaplan, 2013).

### **6.3 Pengaruh Kadar Vitamin D Serum Terhadap Jumlah *Low-Density Granulocytes* Pada Pasien Lupus Eritematosus Sistemik**

Pada penelitian ini, hasil uji korelasi pearson antara kadar vitamin D serum dengan jumlah LGDs didapatkan ( $p$  value < 0.05) sebesar 0.406 yang menunjukkan bahwa tidak ada korelasi antara kadar vitamin D serum dengan jumlah LDGs pada pasien LES.

Sejumlah penelitian pada pasien LES telah melaporkan adanya kaitan antara vitamin D dengan berbagai manifestasi klinis dan abnormalitas respon imun. Defisiensi vitamin D dihubungkan dengan peningkatan penyakit autoimun seperti LES (Kamen *et al.*, 2006). Kadar vitamin D yang sangat rendah (<10 ng/ml) didapatkan pada 22 pasien LES yang mempunyai manifestasi nefritis dan

fotosensitif pada studi yang dilakukan Marco *et al* (2010). Hasil tersebut menunjukkan bahwa defisiensi vitamin D merupakan faktor risiko untuk LES (Marco *et al*, 2010).

Penelitian Handono *et al* tahun 2012 dan 2013 menunjukkan bahwa level vitamin D pada LES secara signifikan lebih rendah dibanding kontrol sehat. rendahnya level vitamin D dihubungkan dengan gangguan regulasi imun, termasuk regulasi aktivitas neutrofil. Pasien LES yang diperiksa menunjukkan pembentukan LDGs dan NETs yang lebih tinggi. Hal ini yang dimungkinkan sebagai penyebab dari meningkatnya kerusakan sel endotel dan aktivitas penyakit pada LES (Handono *et al.*, 2013).

Peran vitamin D dalam pengobatan pasien LES telah dilakukan Handono *et al* tahun 2014. Hasil studi menunjukkan bahwa vitamin D dapat menurunkan kerusakan endotel melalui penurunan aktivitas NETosis. Hasil dari studi ini dapat membuka peluang penggunaan Vitamin D sebagai terapi suplementer bagi pasien LES dengan hipovitamin D untuk mencegah kerusakan endotel.

Hasil kontradiktif yang didapatkan pada penelitian ini bila dibandingkan penelitian lain kemungkinan terkait dengan bias sampel dan pengukuran. Bias sampel terjadi ketika sampel yang digunakan tidak mewakili populasi atau tidak sesuai dengan pertanyaan yang diajukan. Faktor-faktor yang menyebabkan bias sampel adalah ukuran sampel dan seleksi sampel. Ukuran sampel harus cukup besar agar diperoleh nilai rata-rata yang baik. Sampel juga harus memiliki komposisi yang mencerminkan komposisi populasi. Faktor seperti lokasi, usia, gender, etnisitas, kebangsaan, dan lingkungan hidup dapat mempengaruhi data yang dikumpulkan. Sementara itu bias pengukuran berurusan dengan masalah apakah metode pengumpulan data yang dipilih telah sesuai sehingga data yang dikumpulkan merupakan yang paling mewakili kenyataan. Untuk mengevaluasi teknik

pengumpulan data, pengukuran harus dilakukan dengan seteliti mungkin (Siscawati, 2011).

Pada penelitian ini, kemungkinan terjadi bias sampel karena jumlah sampel yang dipakai meskipun sudah memenuhi jumlahnya namun mendekati batas bawah, yakni 33 sampel dari minimal 30. Sedangkan jumlah 33 sampel tersebut merupakan gabungan antara kelompok pasien LES dan kontrol sehingga ketika kelompok pasien LES saja yang berjumlah 22 sampel dikorelasikan kadar vitamin D serum dan jumlah LDGsnya jumlahnya terlalu sedikit. Selain itu, kemungkinan bias sampel selanjutnya adalah masih kurang sesuai penerapan pengambilan sampel dengan kriteria inklusi poin pertama dan kedua. Poin pertama kriteria inklusi adalah pasien LES wanita yang didiagnosis LES dalam jangka waktu maksimal 6 bulan sebelum pengambilan sampel sedangkan poin kedua adalah penyakit LES dalam keadaan aktif dengan skor Mex SLEDAI (Mexican LES Disease Activity Index)  $\geq 5$ . Pada kenyataan di lapangan, pengambilan sampel mengalami kesulitan mencari pasien yang baru didiagnosis LES. Kebanyakan pasien yang datang berobat di poli reumatologi adalah pasien yang sudah remisi dan sedang rawat jalan. Hal ini juga menjelaskan mengapa kriteria skor Mex SLEDAI (Mexican LES Disease Activity Index)  $\geq 5$  tidak selalu terpenuhi disamping tidak selalu dilakukan *scoring* karena keterbatasan SDM pada saat pengambilan sampel.

Pada penelitian ini juga kemungkinan terjadi bias pengukuran yaitu pada saat pembacaan jumlah LDGs dengan *flow cytometry*. Hal ini disebabkan peletakan kursor pada populasi sel-sel granulosit di program pembacaan *flow cytometry* bergantung pada analisis lab. Begitu kursor digeser meskipun masih dalam kumpulan populasi sel granulosit, jumlah sel-sel yang terbaca ikut berubah.