

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian *analytic observational*, yaitu penelitian yang diarahkan untuk menjelaskan suatu keadaan atau situasi. Penelitian ini menggunakan pendekatan analitik, studi kasus kontrol dengan metode pengambilan sampel *cross sectional*. Artinya peneliti hanya melakukan observasi dan pengukuran variabel pada satu saat itu juga. Pengukuran variabel tidak terbatas harus tepat pada satu waktu bersamaan, namun mempunyai makna bahwa setiap subyek hanya dikenai satu kali pengukuran, tanpa dilakukan tindakan lanjut atau pengulangan pengukuran (Saryono & Setiawan, 2010, p.85).

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan hubungan antara kadar vitamin D serum dengan persentase peningkatan pembentukan NETs melalui MPO-DNA. Variabel dependen dalam penelitian ini adalah pembentukan NETs yang dinyatakan dalam besarnya persentase peningkatan absorbansi MPO-DNA diatas kontrol, yakni netrofil yang tidak diinduksi PMA. Persentase peningkatan NETs tersebut digunakan sebagai parameter untuk mengetahui hubungan vitamin D sebagai imunomodulator terhadap respon autoimunitas pada penyakit LES yang dipicu saat NETosis.

6.1 Karakteristik Sampel Penelitian

Kami mengambil sampel darah wanita dengan usia produktif, dimana pada kelompok pasien LES rata-rata memiliki usia 33,27 (1,22) tahun dan pada kelompok kontrol rata-rata memiliki usia 37,00 (1,37) tahun. Tidak ada perbedaan yang bermakna antara usia kelompok pasien LES dan kelompok kontrol, karena

nilai $p > 0,05$, yakni 0,449. Hal tersebut sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa puncak onset terjadinya LES ini dimulai pada kategori usia remaja akhir sampai dengan dewasa usia 40 tahun-an, dengan rasio wanita : laki-laki adalah 9 : 1 (Cervera *et al*, 2009; Crispin *et al*, 2010).

Berdasarkan pertimbangan-pertimbangan tertentu, jumlah sampel pada pasien LES yang didapatkan sebanyak 22 sampel dan jumlah sampel pada kelompok kontrol sebanyak 10 sampel. Perjalanan penyakit SLE ditandai dengan eksaserbasi dan remisi, memerlukan pemantauan yang ketat akan aktivitas penyakitnya. Evaluasi aktivitas penyakit ini berguna sebagai panduan dalam pemberian terapi. Indeks untuk menilai aktivitas penyakit seperti SLEDAI, MEX-SLEDAI, SLAM, BILAG Score, dsb. Dianjurkan untuk menggunakan MEX-SLEDAI atau SLEDAI. MEX-SLEDAI lebih mudah diterapkan pada pusat kesehatan primer yang jauh dari tersedianya fasilitas laboratorium canggih. Menurut kriteria MEX-SLEDAI, pasien yang memiliki skor < 2 dikatakan dalam kondisi inaktif, kemudian pasien yang memiliki skor 2-5 dikategorikan sebagai kemungkinan aktif (*probably active*), dan pasien yang memiliki skor > 5 dinyatakan dalam kondisi aktif. (Khana *et al.*, 2004).

Pada penelitian ini pasien LES yang berobat di Poli Reumatologi RS.Saiful Anwar memiliki skor MEX-SLEDAI diatas 5, yang berarti bahwa pasien tersebut dalam keadaan aktif dengan manifestasi klinis terbanyak ialah artritis dan nefritis. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang menyebutkan bahwa 95% pasien LES mengalami artritis dan artralgia. Lupus nefritis juga merupakan manifestasi yang paling sering dan paling potensial menimbulkan kerusakan pada pasien LES. Secara umum, lupus nefritis terjadi pada lebih dari setengah pasien LES. (Cojocar *et al.*, 2011). Studi in vitro yang dilakukan oleh Leffler yang menemukan

bahwa pada pasien LES aktif memiliki kemampuan degradasi NETs yang rendah (Leffler *et al.*, 2012). Pada pasien LES yang memiliki kemampuan degradasi NETs yang lemah dan tidak efektif tersebut berkaitan dengan patogenesis LES (Hakkim *et al.*, 2010).

6.2 Perbedaan Kadar Vitamin D Serum pada Kelompok Kontrol Sehat dan Kelompok Pasien LES

Pada penelitian ini mengkonfirmasi kembali perbedaan kadar vitamin D pada pasien LES dan kontrol sehat. Penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata kadar vitamin D pada pasien LES dibawah normal yakni 22,17 (4,401) ng/ml dan secara signifikan ($p=0,000$) lebih rendah dibandingkan dengan kontrol sehat yakni 30,89 (1,247) ng/ml. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Handono, yang menyatakan bahwa kadar vitamin D pada pasien LES lebih rendah dibandingkan kontrol sehat. (Handono *et al.*, 2013). Penelitian lain juga menyebutkan bahwa rendahnya kadar vitamin D sering dialami oleh pasien LES, dimana sebesar 75% pasien memiliki kadar vitamin D < 30ng/ml, bahkan 15% pasien memiliki kadar vitamin D yang sangat rendah, yakni < 10ng/ml (Ruiz-Irastorza *et al.*, 2008). Studi *cross-sectional* lain juga dilaporkan oleh Chen S. menunjukkan kadar vitamin D yang rendah pada pasien LES (11.5 ng/ml), dibandingkan dengan pasien penyakit autoimunitas lain seperti Rheumatoid Arthritis (RA) yakni sebesar 54.6 ng/ml maupun dibandingkan dengan kontrol (59.2 ng/ml) (Chen *et al.*, 2007).

6.3 Perbedaan Persentase Peningkatan Pembentukan NETs pada Kelompok Kontrol Sehat dan Kelompok Pasien LES

Pada penelitian ini juga mengkonfirmasi kembali perbedaan pembentukan NETs pada pasien LES dan kontrol sehat. Pada penelitian ini terdapat perbedaan yang signifikan ($p=0,006$) antara jumlah pembentukan NETs pada pasien LES dengan kontrol, dimana pada pasien LES menunjukkan persentase peningkatan pembentukan NETs yang lebih tinggi dibanding kontrol sehat (129,53 (24,28) vs 112,38 (7,54), %). Hal tersebut dapat terjadi karena netrofil pada pasien LES lebih teraktivasi dan lebih mudah membentuk NETs (Brinkmann & Zychlinsky, 2012). Pada pasien LES memiliki lingkungan sitokin yang abnormal, yang mana hal tersebut dapat meningkatkan pembentukan NETs secara *in vivo*. (Yap., 2013; Zhang *et al.*, 2014) Selain itu, adanya LDGs pada PBMC pasien LES dapat membentuk NETs secara spontan dan lebih ganas daripada netrofil normal. (Denny *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2011). Pada *in vitro*, DNase I bertanggungjawab atas degradasi NETs, dan ketidakcukupan dalam klierens NETs berhubungan dengan patogenesis lupus nefritis (Hakim *et al.*, 2010; Leffler *et al.*, 2012). Jika NETs tidak dapat didegradasi oleh DNase I, NETs tersebut dapat membentuk kompleks protein yang dapat menetap abnormal dalam jangka waktu lama, yang pada akhirnya memperpanjang stimulasi antigen dan deposisi pada membran basalis glomerulus yang dapat menginduksi nefritis (Hakim *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2011; Lande *et al.*, 2007).

6.4 Hubungan Antara Kadar Vitamin D Serum dengan Persentase Peningkatan Pembentukan NETs pada Pasien LES

Telah diketahui bahwa pada pasien LES memiliki kadar vitamin D yang

lebih rendah dibandingkan kontrol. Selanjutnya, pada pasien LES juga menunjukkan pembentukan NETs yang lebih tinggi dibanding kontrol. Hasil penelitian kami menunjukkan tidak ada hubungan antara kadar vitamin D dengan pembentukan NETs pada pasien LES ($p > 0,05$). Beberapa faktor yang mungkin dapat mempengaruhi hal tersebut yang akan dibahas sebagai berikut.

NETs itu dapat dipicu oleh berbagai macam stimulasi seperti infeksi mikroba (bakteri, jamur, protozoa, virus), mediator inflammasi, ROS, sitokin, serta dari stimulasi non-fisiologis seperti PMA (Varju, 2014). Sehingga NETs tidak spesifik untuk kondisi autoimun, melainkan kondisi inflamasi dan berbagai jenis infeksi dapat turut meningkatkan pembentukan NETs.

Selain itu, LDGs pada PBMC pasien LES dapat membentuk NETs secara spontan dan lebih ganas dari netrofil normal. Peningkatan LDGs yang abnormal mampu membentuk NETs yang abnormal pula dan lebih sering (Zhang *et al.*, 2014). Walaupun netrofil pada LES tidak dapat membentuk NETs secara spontan, namun pada kultur sel tersebut mampu mengeluarkan DNA yang dapat menginduksi ekspresi IFN- α mRNA oleh sel pDC yang serupa dengan LDG-NETs (Darrach, 2013). Pada penelitian ini kami mengukur pembentukan NETs pada netrofil pasien LES dengan induksi PMA secara *in vitro* dan menunjukkan hasil pembentukan NETs pada pasien LES yang lebih besar dibanding kontrol, akan tetapi tidak menutup kemungkinan apabila dilakukan pengukuran pembentukan NETs pada LDG menunjukkan hasil yang lebih besar.

Pembentukan NETs juga dipengaruhi oleh aktivitas penyakitnya. Studi *in vitro* yang dilakukan oleh Leffler yang menemukan bahwa pada pasien LES aktif memiliki kemampuan degradasi NETs yang rendah (Leffler *et al.*, 2012). Pada

pasien LES yang memiliki kemampuan degradasi NETs yang lemah dan tidak efektif tersebut berkaitan dengan patogenesis LES (Hakkim *et al.*, 2010).

Lebih dari 70% komponen NETs adalah autoantigen yang poten pada LES dan penyakit autoimun lain (Knight *et al.*, 2012; Darrah, 2012). NETs tidak hanya terdiri dari MPO-DNA saja akan tetapi juga terdapat *citrullinated histones*, berbagai protein bakterisidal dan/atau enzim seperti *cathelicidin LL-37*, dan *neutrophil elastase* (NE). (Neeli *et al.*, 2008 ; Papayannopoulos *et al.*, 2010). NE dan MPO adalah protein granuler yang dieksternalisasikan pada saat yang bersamaan selama NETs. Penelitian yang dilakukan Handono menunjukkan bahwa NE dan MPO tidak dieksternalisasikan dalam jumlah yang sama. 1,25 (OH)₂ D3 tidak menurunkan eksternalisasi dari MPO secara signifikan seperti pada NE. Namun MPO memiliki kecenderungan yang sama untuk turun seperti NE pada pemberian 1,25(OH)₂D3 10 nM (Handono *et al.*, 2014). Hal tersebut menunjukkan peran vitamin D yang kurang efektif dalam memodulasi NETs khususnya dalam eksternalisasi MPO-DNA.

Selanjutnya faktor lain yang mempengaruhi ketidaksignifikanan hasil adalah faktor vitamin D. Pada pasien LES cenderung menghindari sinar matahari karena sinar matahari dapat memicu timbulnya *flare* atau kemerahan pada penderita sehingga sintesis vitamin D-nya menjadi terganggu (Kamen, 2010). Vitamin D sendiri memiliki efek sebagai imunomodulator terhadap sel-sel imun tidak hanya pada sel granulosit, melainkan juga pada sel limfosit T, limfosit B, monosit, dan sel dendrit. Masing-masing sel imun tersebut mengekspresikan VDR dan memproduksi enzim *1 α -Ohase* dan *24-hydroxylase* sehingga mereka mampu memproduksi 1,25(OH)₂D aktif secara lokal (Kamen *et al.*, 2010). Reseptor vitamin D (VDR) dan molekul ikatan protein dengan vitamin D

ditemukan pada netrofil yang mana bertanggungjawab dalam respon netrofil untuk sirkulasi molekul vitamin D (Dimartino *et al.*, 2001). Penelitian yang dilakukan oleh Hirsch menunjukkan bahwa penurunan ekspresi VDR dan 1α -hydroxylase dikarenakan resistensi dari modulasi netrofil dalam respon inflamasi (Hirsch *et al.*, 2011). Dalam penelitian ini tidak dievaluasi VDR dan 1α -hydroxylase sehingga faktor-faktor tersebut mungkin perlu ditinjau lebih lanjut terkait fungsi imunomodulasi vitamin D.

Pada penelitian ini juga mencoba untuk mengkorelasikan hubungan antara kadar vitamin D dengan pembentukan NETs pada kelompok kontrol sehat. Hasilnya menunjukkan tidak ada hubungan antara kadar vitamin D dengan pembentukan NETs ($p > 0,05$). Tidak adanya hubungan antara kadar vitamin D dengan NETs tersebut mungkin disebabkan karena NETs pada kontrol sehat tidak dianggap sebagai autoantigen, dan proses degradasi NETs pada kontrol sehat juga berlangsung normal. Sehingga apabila terjadi defisiensi vitamin D pada kelompok kontrol mungkin tidak berhubungan dengan peningkatan pembentukan NETs. Ketidaksignifikanan hasil mungkin juga dipengaruhi oleh faktor sampel yang sedikit.

6.5 Keterbatasan Penelitian

Penelitian kami memiliki beberapa keterbatasan diantaranya jumlah sampel yang diperoleh cukup sedikit oleh karena pengambilan sampel secara *purposive* dengan pertimbangan-pertimbangan tertentu serta keterbatasan segi waktu, SDM, dan biaya. Selain itu, penelitian ini tidak mengkorelasikan eksternalisasi NETs yang lain seperti *citrullinated histones*, *cathelicidin LL-37*, dan *neutrophil elastase* (NE), dimana komponen NETs tersebut juga turut

mempengaruhi respon kompleks autoimunitas dan akhirnya terlibat dalam kerusakan sel endotel. Oleh karena itu, masih dimungkinkan adanya penelitian selanjutnya yang meneliti hubungan antara vitamin D dengan komponen NETs lain.