

PEMBERIAN *SCLEROSTIN* DAPAT MENURUNKAN JUMLAH MAKROFAG LIMPA TIKUS WISTAR MODEL OSTEOPOROSIS

Soraya Coraima Zahwa¹, dr. Maimun Zulhaidah Arthamin, M.Kes, Sp.PK², dr. Cholid Tri Tjahjono, M.Kes, Sp.JP³

ABSTRAK

Pada wanita yang telah mengalami menopause mengalami penurunan kadar estrogen dalam tubuhnya hingga mengakibatkan menurunnya sistem imun seluler serta apoptosis dari osteoklas. Penurunan densitas tulang menunjukkan adanya penurunan osteoblas, osteosit, serta aktivitas sel seperti makrofag sehingga dapat mempercepat terjadinya osteoporosis. Protein *Sclerostin* akan meningkatkan pembentukan antibodi anti-*sclerostin* sehingga dapat menurunkan jumlah makrofag dalam tubuh. Penelitian ini bertujuan membuktikan bahwa protein *Sclerostin* dapat menurunkan jumlah makrofag limpa pada tikus wistar model hipoestrogen. Penelitian ini menggunakan *true experimental design* secara *in vivo* dengan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*. Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan, maka jumlah hewan uji untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan menggunakan rumus $[(np-1) - (p-1)] \geq 16$, dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan; p = jumlah perlakuan. $(np-1) - (p-1) \geq 16$; $(5n-1) - (5-1) \geq 16$; $n \geq 4,2 \sim 5$ $n = 5$; $p = 5$. Randomisasi dengan simple random sampling. Data jumlah makrofag limpa tikus dihitung rerata 20 lapang pandang. Hasil penghitungan jumlah makrofag limpa tikus dianalisa secara statistik menggunakan program *IBM SPSS Statistics 20* signifikansi 0,05 ($p = 0,05$), taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 90,05$). Uji yang dilakukan adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way ANOVA*, *Post hoc test*, dan uji korelasi Pearson. Hasil penelitian menunjukkan pemberian *Sclerostin* dapat menurunkan jumlah makrofag pada limpa tikus wistar model hipoestrogen.

Kata kunci : *Sclerostin*, makrofag, osteoporosis, tikus model osteoporosis



The Giving Of Sclerostin May Decrease The Total Macrophages Inside The Spleen Of Osteoporosis Model Wistar Rats

ABSTRACT

Menopause women undergo decreased level of oestrogen causing lowered cellular immune system and apoptosis of osteoclasts. The decline in bone density shows that there is a decrease of osteoblasts, osteocytes, as well as the activity of macrophages resulting the acceleration process of osteoporosis. Sclerostin protein will increase the formation of *anti-sclerostin* antibody, so that it is able to decrease the total of macrophage within the body. The research was aimed to prove that *Sclerostin* protein may decrease the total macrophages inside the spleen of hypo-oestrogen wistar rats model. This study used true experimental design by in vivo using Randomized Post Test Only Controlled Group Design. There were 5 treated groups in this experiment, thus the number of tested animals for each treatment can be found using the formula $[(np-1) - (p-1)] \geq 16$, by n = the number of repetition of each treatment; p = the number of treatment. $(np-1) - (p-1) \geq 16$; $(5n-1) - (5-1) \geq 16$; $n \geq 4,2 \sim 5$ $n = 5$; $p = 5$. Randomization using simple random sampling. Data of total macrophages within the spleen was calculated by the average of 20 high field views. The result of the calculation of total rat macrophages was analyzed statistically using IBM SPSS Statistics 20 by significancy of 0,05 ($p = 0,05$). Conducted tests were normality test, homogeneity test, One-way ANOVA test, Post hoc test, and Pearson Correlation test. The conclusion is *Sclerostin* protein is able to decrease the total macrophages inside the spleen of hypo-oestrogen wistar rats model.

Keywords: Sclerostin, macrophages, osteoporosis, model wistar rats

¹Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

²Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

³Laboratorium Ilmu Kesehatan Anak Rumah Sakit Saiful Anwar Malang



PENAHULUAN

Definisi osteoporosis menurut World Health Organization (WHO) adalah suatu penyakit yang ditandai dengan berkurangnya massa tulang dan kelainan mikroarsitektur jaringan tulang, dengan akibat meningkatnya kerapuhan tulang dan resiko terjadinya fraktur tulang (Bulstrode & Swales, 2007). Penyakit kerapuhan tulang ini melanda seluruh dunia dan telah melumpuhkan jutaan orang. Fakta dari lembaga National Osteoporosis Foundation di Amerika menunjukkan hasil yang memprihatinkan. Lebih dari 1.5 juta orang di Amerika menderita tulang patah setiap tahunnya yang diakibatkan oleh osteoporosis dan hampir 34 juta orang lainnya diperkirakan mengalami penurunan densitas tulang yang mengakibatkan mereka berada dalam kondisi terancam menderita osteoporosis (Clupster, 2009).

Data dari WHO diketahui bahwa di seluruh dunia pada tahun 2010 ada sekitar 200 juta orang yang menderita Osteoporosis. Pada tahun 2050 diperkirakan angka patah tulang pinggul akan meningkat 2 kali lipat pada wanita daripada pria. Hasil penelitian Whitepaper yang dilaksanakan bersama perhimpunan Osteoporosis Indonesia tahun 2009, melaporkan bahwa proporsi pasien Osteoporosis pada penduduk yang berusia diatas 50 tahun, adalah 32,3% pada wanita dan 28,8% pada pria (Depkes RI, 2012).

Pembentukan tulang paling cepat terjadi pada usia pubertas, ketika tulang menjadi makin besar, makin panjang, makin tebal, dan makin padat yang akan mencapai puncaknya pada usia sekitar 25-30 tahun. Berkurangnya massa tulang mulai terjadi setelah usia 30 tahun, yang akan makin bertambah setelah diatas 40 tahun, dan akan berlangsung terus dengan bertambahnya usia, sepanjang hidupnya. Hal inilah yang mengakibatkan terjadinya penurunan massa tulang yang

berakibat pada osteoporosis (Tandra, 2009).

Perempuan pascamenopause yang menderita osteoporosis juga mendapatkan estrogen (biasanya bersama dengan progesteron) atau alendronat, yang dapat memperlambat atau menghentikan penyakitnya (Syam, 2014). Dalam sebuah penelitian tentang hubungan antara estrogen dengan sel monosit dalam suatu biakan sel, didapatkan bahwa terapi substitusi estrogen pada wanita postmenopause dapat menurunkan jumlah monosit yang beredar di sirkulasi. Dari penelitiannya yang lain, ternyata peningkatan estrogen juga dapat merangsang terjadinya apoptosis pada sel makrofag terutama yang mengekspresikan Estrogen Reseptor Beta (ER β) dan tidak berpengaruh pada makrofag yang mengekspresikan Estrogen Alfa (ER α). Dia berhipotesis estrogen dapat menurun atau menghambat aktifitas enzim yang membantu metabolisme di dalam sitosol sel makrofag (Gil Mor, 2003).

Meskipun demikian, estrogen umumnya memberi efek pada resorpsi tulang yang diperantarai tidak langsung melalui faktor parakrin yang dihasilkan oleh osteoblas. FDA menyepakati estrogen sebagai terapi pencegahan osteoporosis tetapi hanya digunakan dalam jangka pendek pada wanita yang memerlukan terapi estrogen untuk manajemen gejala menopause seperti hot flush. Risiko penggunaan jangka panjang lebih besar dibandingkan manfaat yang diberikan (Fauci *et al*, 2008).

Sclerostin sendiri merupakan protein yang disekresi oleh osteosit yang berperan sebagai down regulates pada pembentukan tulang oleh osteoblas. Sclerostin berperan penting dalam proses remodeling tulang karena *Sclerostin* merupakan protein yang mampu menghambat aktivitas osteoblas. Penelitian klinis praklinis dan awal inhibitor sklerostin telah menunjukkan stimulasi

yang kuat dari pembentukan tulang osteoblastik (Papapoulos, 2011). Dengan adanya beberapa penelitian tersebut, kami ingin melakukan uji imunogenitas seluler khususnya respon terhadap jumlah makrofag terhadap protein *Sclerostin* protein yang diharapkan menjadi kandidat vaksin osteoporosis.

Tujuan Penelitian adalah menentukan bahwa protein *Sclerostin* dapat menurunkan jumlah makrofag limpa tikus wistar model hipoestrogen

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan *true experimental design* secara *in vivo* menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only Controlled Group Design*.

Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah model tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar betina usia 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 gram. Dalam penelitian ini terdapat 5 kelompok perlakuan, maka jumlah hewan uji untuk masing-masing perlakuan dapat dicari dengan menggunakan rumus $[(np-1) - (p-1)] \geq 16$, dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan; p = jumlah perlakuan (Christina, 2010). $(np-1) - (p-1) \geq 16$; $(5n-1) - (5-1) \geq 16$; $n \geq 4,2 \sim 5$ $n = 5$; $p = 5$. Randomisasi dengan simple random sampling.

Perlakuan yang diberikan pada sampel adalah dengan membagi menjadi lima perlakuan, yang terdiri dari :

1. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (tikus yang tidak diovariectomi dan tanpa diberikan protein sclerostin)
2. Kelompok 2: kelompok kontrol positif (tikus yang diovariectomi dan tanpa diberikan injeksi protein sclerostin)

3. Kelompok 3: tikus yang diovariectomi dengan diberikan injeksi antigen sclerostin 100 ng
4. Kelompok 4: tikus yang diovariectomi dengan diberikan injeksi antigen sclerostin 1 μ g
5. Kelompok 5: tikus yang diovariectomi dengan diberikan ajuvan (Alumunium hidroksida)

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 20 Maret 2016 jam 10:54 WIB sampai tanggal 20 Maret 2016 jam 12.45 WIB di Laboratorium Instalasi Laboratorium Sentral RSSA, Laboratorium Fisiologi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Patologi Anatomi, Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Variabel Penelitian

Variabel bebas penelitian ini adalah pemberian protein pencegah osteoporosis dengan menggunakan berbagai bahan yaitu *sclerostin* dan ajuvan (alum). Variabel tergantung adalah jumlah makrofag limpa.

Prosedur Penelitian

1. Perawatan Hewan Coba

Tikus wistar sebanyak 25 ekor dirawat dalam kandang masing – masing satu tikus satu kandang. Makan dan minum diberikan satu kali sehari. Sekam diganti satu minggu dua kali dan tikus ditimbang setiap minggunya.

2. Perlakuan Ovariectomi

Tikus difiksasi dalam posisi supine, kemudian dilakukan anestesi menggunakan ketamin i.m dengan dosis 40mg/kgBB. Bulu abdomen dicukur, lalu dilakukan sterilisasi menggunakan alkohol 70% dan betadine solution lalu ditutup duk steril dan Dilakukan insisi transabdominal di atas uterus sepanjang 1,5-2 cm. Oviduct bagian distal dan ovarium diligasi

kemudian oviduct dan ovarium diangkat. Luka potongan diberi basitrasin serbuk (Nebacetin). Prosedur yang sama dilakukan untuk ovarium kanan. Luka insisi dijahit dengan catgut, kemudian diolesi betadine dan Nebacetin, ditutup kasa steril. Kemudian diberikan Gentamycin i.m dengan dosis 60 – 80 mg/kgBB 1 kali per hari selama 3 hari dan Novalgin i.m dengan dosis 0,3 ml selama 1 hari (Christina, 2010).

3. Preparasi Protein *Sclerostin*

Larutkan 2 mg *Sclerostin* dalam 500 µl dari buffer konjugasi. Kemudian larutkan 10 mg EDC dalam 1 ml deionized water dan segera tambahkan 50 µl cairan ini ke dalam cairan peptide (Lateef, 2007). Konjugasi dan *coupling* protein karier dimulai dengan menambahkan 2 mg KLH yang terlyopilisasi ke dalam 200 µl buffer konjugasi. Lalu larutkan 2 mg *sclerostin* dalam 500 µl dari buffer konjugasi tersebut. Kemudian tambahkan 500 µl cairan peptide ke dalam 200 µl cairan protein karier. Setelah itu larutkan 10 mg EDC dalam 1 ml deionized water dan segera tambahkan 50 µl cairan ini ke dalam cairan peptide-karier (Lateef, 2007).

4. Injeksi Protein *Sclerostin*

Protein diinjeksikan bersama dengan ajuvan secara intraperitoneal sesuai dengan kadar pada masing-masing kelompok. Protein primer diinjeksikan pada hari ke-0, sedangkan *booster* diinjeksikan setiap 2 minggu sekali selama 2 bulan.

5. Pembedahan Hewan Coba

Sebelum dibedah, selama 12 jam tikus dipuasakan agar data yang dihasilkan tidak dipengaruhi oleh konsumsi terakhir. Tikus yang akan dibedah harus dalam keadaan hidup. Pembedahan

diawali dengan pemberian anestesi per inhalasi dengan kloroform dalam wadah tertutup. Setelah tikus tidak sadar, tikus difiksasi dalam keadaan terlentang dengan jarum di atas papan yang dialasi alumunium foil. Lalu, perut dibersihkan alkohol 70%, lalu dibedah. Limpa tikus diambil secara steril dengan gunting bedah dan pinset, kemudian limpa segera dimasukkan ke dalam botol steril yang berisi 3 ml PBS steril atau RPMI standar steril (Belinda *et. al*, 2010; Nugroho 2007).

Penghitungan Jumlah Makrofag

1. Pembuatan Preparat Jaringan Limpa

Jaringan limpa diambil sepanjang 1,5 cm. Kemudian difiksasi dengan cara direndam larutan *Buffer Neutral Formalin (BNF)* 10% selama 24 jam, setelah itu dilakukan *processing* jaringan dan diblok parafin. Selanjutnya dilakukan potongan serial terhadap blok parafin tersebut dengan ketebalan 5 µm dan didehidrasi pada jaringan limpa yang berada pada gelas obyek. Kemudian, dilakukan pewarnaan *Hematoksilin dan Eosin* (Izzaty *et. al*, 2014).

2. Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin

Sampel yang telah dipotong diletakkan di atas gelas objek. Kemudian dilakukan rehidrasi dengan alkohol bertingkat. Tetesi dengan Harris Hematoksilin, cuci dengan alkohol bertingkat. Tetesi dengan Eosin, cuci dengan alkohol bertingkat, bilas dengan aquades, keringkan. Kemudian bilas dengan air mengalir, keringkan. Tetesi dengan emelian dan tutup dengan coverslip (Arieska, 2010).

3. Penghitungan Jumlah Makrofag Limpa

Dengan mikroskop cahaya dilihat jumlah seluruh sel makrofag

dengan perbesaran 400 kali. Tiap 20 lapang pandang tersebut hasil uji statistiknya

Pengamatan

Pengamatan efek induksi protein *sclerostin* apakah dapat meningkatkan atau menurunkan jumlah makrofag pada limpa tikus Wistar model osteoporosis.

Pengumpulan Data

Data jumlah makrofag limpa tikus dihitung rerata 20 lapang pandang, pembesaran 1000x dengan mikroskop cahaya.

Analisis Data

Hasil penghitungan jumlah makrofag limpa tikus dianalisa secara statistik menggunakan program *IBM SPSS Statistics 20* signifikansi 0,05 ($p = 0,05$), taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 90,05$). Uji yang dilakukan adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way ANOVA*, *Post hoc test*, dan uji korelasi Pearson (Dahlan, 2004).

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain penelitian sebenarnya (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan *randomized post test only controlled group design* pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Penelitian ini menggunakan strategi penelitian berupa ovariektomi untuk mendapatkan model hewan coba dengan kondisi hipoestrogen (model osteoporosis), dan selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap makrofag limpa.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakokinetika Farmasi, Laboratorium Fisiologi, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Patologi Anatomi, dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Agustus hingga November 2016.

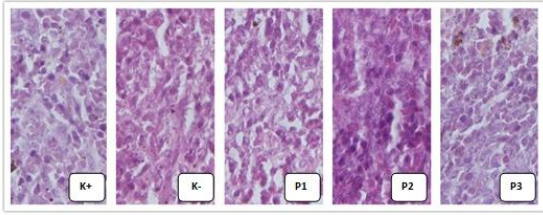
Penelitian ini menggunakan 25 ekor hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Yang terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Kelima kelompok tersebut adalah Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (tikus yang tidak diinduksi ovariektomi dan tanpa diberikan protein sclerostin); Kelompok 2: kelompok kontrol positif (tikus yang diinduksi ovariektomi dan tanpa diberikan injeksi protein sclerostin); Kelompok 3: tikus yang diinduksi ovariektomi dengan diberikan injeksi antigen sclerostin 100 ng; Kelompok 4: tikus yang diinduksi ovariektomi dengan diberikan injeksi antigen sclerostin 1 μ g; Kelompok 5: tikus yang diinduksi ovariektomi dengan diberikan ajuvan (Alumunium hidroksida)

Protein Sclerostin, diinjeksikan bersama dengan ajuvan secara intraperitoneal sesuai dengan kadar pada masing-masing kelompok. Protein primer diinjeksikan pada hari ke-0, sedangkan *booster* diinjeksikan setiap 2 minggu sekali selama 2 bulan. Setelah 2 bulan perlakuan, tikus dikorbankan dan diambil organ limpanya. Selanjutnya, dilakukan pengecatan hematoksilin eosin dan dilakukan pengamatan secara mikroskopis. Setelah didapatkan data pengamatan, dilakukan uji analisa data. Hasil penelitian ini dianalisa menggunakan program analisis statistik, *IBM SPSS (Statistical Products and Service Solutions) Statistics, version 22.0 for windows*. Dalam perhitungan hasil penelitian ini digunakan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

Jumlah Makrofag Limpa Tikus Model Osteoporosis

Pemeriksaan jumlah makrofag menggunakan metode pengecatan hmeatoksilin eosin pada sampel limpa tikus wistar menggunakan mikroskop dengan pembesaran 1000x. Metode pemeriksaan dilakukan dengan melakukan pengamatan pada 20 lapang pandang dari tiap sampel dan kelompok. Dokumentasi

hasil pengamatan dibawah mikroskop dari tiap kelompok perlakuan ditampilkan sebagai berikut



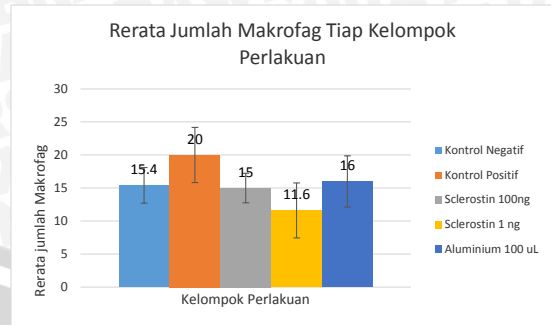
Gambar 5.1 Hasil pengecatan Hematoksin Eosin Kelompok Kontrol Dan Kelompok Perlakuan.

1. Kontrol positif (+)
2. Kontrol negatif (-)
3. Injeksi Sclerostin 100 ng + Aluminium Hidroksida 100 uL
4. Injeksi Sclerostin 1 ug + Aluminium Hidroksida 100 uL
5. Aluminium Hidroksida 100 uL

Tabel 5.1 Nilai Rerata dan Standar Deviasi Jumlah Makrofag Limpa Tikus Model Osteoporosis

Kelompok	Rerata (SD)	Signifikansi (p)
Kontrol Negatif	15.4 (2.7)	0.023*
Kontrol Positif	20 (4.18)	
Sclerostin 100 ng	15 (2.24)	
Sclerostin 1 ng	11.6 (4.16)	
Aluminium Hidroksida 100 uL	16 (3.87)	

*kelompok yang memiliki perbedaan yang bermakna (signifikan) ($p < 0.05$)



Gambar 5.2 Grafik Histogram Rerata dan Standar Deviasi Jumlah Makrofag Limpa

Selanjutnya, data tersebut dianalisa secara statistik untuk mengetahui hubungan dan perbedaannya. Sebelumnya, dilakukan uji asumsi data, yaitu uji normalitas dan homogenitas data, untuk menentukan kelompok uji statistik yang digunakan, parametrik atau non parametrik. Uji normalitas data menggunakan Saphiro Wilk, karena jumlah data < 50 . Hasil uji normalitas data, $p = 0.957$ ($p > 0.05$), dan uji homogenitas data, $p = 648$ ($p > 0.05$) Karena uji asumsi data terpenuhi, maka selanjutnya dilakukan uji parametrik, ANOVA dan Post Hoc Tukey.

Uji ANOVA dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok perlakuan yang diamati secara keseluruhan. Hasil uji ANOVA menunjukkan nilai $p = 0.023^*$ ($p < 0.05$). Selanjutnya, dilakukan uji korelasi data Pearson, untuk mengetahui hubungan antara dosis pemberian *sclerostin* dengan jumlah makrofag di limpa. Hasil uji korelasi

$$\text{Jumlah Sel Makrofag} = 17.943 - 0.007 \text{ dosis}$$

Pearson, menunjukkan nilai $p = 0.013$, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang bermakna (signifikan) antara jumlah makrofag di limpa tikus model osteoporosis dengan dosis pemberian *sclerostin*. Besar koefisien korelasi Pearson, $(R) = -0.623$. Yang terakhir dilakukan uji regresi linier, dan didapatkan hasil nilai $R^2 = 0.388$ dan persamaan garis

Koefisien determinasi (R^2) adalah ukuran ketepatan atau kecocokan garis regresi. Selain itu, R^2 juga dapat digunakan untuk mengukur besar proporsi keragaman total yang dapat dijelaskan oleh garis regresi.

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris (*true eksperimental-post test only control group design*), untuk mengetahui pengaruh pemberian *Sclerostin* terhadap jumlah makrofag limpa tikus wistar model hipoestrogen. Penelitian ini menggunakan metode ovariectomi untuk mendapatkan model hewan coba dengan kondisi hipoestrogen (model osteoporosis), dan selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap makrofag limpa.

Pada wanita yang telah mengalami menopause mengalami penurunan kadar estrogen dalam tubuhnya hingga mengakibatkan menurunnya sistem imun seluler serta apoptosis dari osteoklas. Penurunan densitas tulang sendiri adalah adanya penurunan osteoblas, osteosit, serta aktivitas sel seperti makrofag sehingga dapat mempercepat terjadinya osteoporosis. Protein *Sclerostin* akan meningkatkan pembentukan antibodi *anti-sclerostin* sehingga dapat menurunkan jumlah makrofag dalam tubuh. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa pemberian *sclerostin* dapat menurunkan jumlah makrofag pada limpa tikus wistar model osteoporosis.

Penelitian ini menggunakan 25 ekor hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Yang terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus. Kelima kelompok tersebut adalah Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (tikus yang tidak diovariectomi dan tanpa diberikan protein *sclerostin*); Kelompok 2: kelompok kontrol positif (tikus yang diovariectomi dan tanpa diberikan injeksi protein *sclerostin*); Kelompok 3: tikus yang diovariectomi dengan diberikan injeksi antigen *sclerostin*

100 ng; Kelompok 4: tikus yang diovariectomi dengan diberikan injeksi antigen *sclerostin* 1 μ g; Kelompok 5: tikus yang diovariectomi dengan diberikan ajuvan (Alumunium hidroksida).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok kontrol positif menunjukkan jumlah makrofag yang terbesar, dan kelompok yang diberikan injeksi *sclerostin* 1 ng menunjukkan jumlah sel makrofag yang terkecil (11.6 ± 4.16). Kelompok lainnya, berada pada kisaran rerata 15, dan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata satu sama lain.

Hasil uji statistik dengan ANOVA menunjukkan nilai $p = 0.023^*$ ($p < 0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna (signifikan) antara kelompok perlakuan yang diamati terhadap jumlah sel makrofag. Selanjutnya, dilakukan uji korelasi data Pearson yang menunjukkan nilai $p = 0.013$, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang bermakna (signifikan) antara jumlah makrofag di limpa tikus model osteoporosis dengan dosis pemberian *sclerostin*. Besar koefisien korelasi Pearson, (R) = -0.623 , artinya hubungan antara jumlah makrofag dengan dosis pemberian *sclerostin* memiliki arah negatif dan kekuatan sebesar 0.623 . Arah negatif berarti, semakin tinggi dosis *sclerostin*, maka semakin rendah jumlah makrofag pada limpa tikus model osteoporosis. Besar koefisien korelasi 0.623 , berarti kekuatan korelasinya sedang.

Yang terakhir dilakukan uji regresi linier, dan didapatkan hasil nilai $R^2 = 0.388$ dan persamaan garis

Hasil pengujian nilai $R^2 = 0.388$

Jumlah Sel Makrofag = 17.943 – 0.007 dosis

menjelaskan bahwa sumbangan atau kontribusi dari variasi dosis *sclerostin* dalam menjelaskan keragaman variabel jumlah makrofag sebesar 38.8 %, sedangkan 61.2% lainnya disumbangkan oleh variabel lainnya yang tidak

dimasukkan ke dalam persamaan ini. Persamaan garis regresi linier, ditunjukkan pada halaman lampiran.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Dijkstra dan Papapaoulos (2016), dilakukan pengamatan terhadap pengaruh inhibisi sclerostin terhadap kepadatan tulang di femur dan vertebrae. Dari 4 studi penelitian yang dilakukan dengan metode yang sama, yaitu ovariectomy, diketahui bahwa semua yang diberikan antibody sclerostin menunjukkan peningkatan kepadatan dan kekuatan tulang yang bermakna. Penelitian yang pertama adalah tikus dengan usia 18 bulan yang dilakukan ovariektomi pada usia 6 bulan, dan diberikan Scl-AbII 2x/minggu selama 5 minggu, Vertebra dan Femur meningkat (Li *et al.*, 2009). Studi yang kedua adalah tikus berusia 6 bulan yang dilakukan ovariektomi pada usia 4 bulan dan diberikan Scl-AbVi 1x/minggu selama 26 minggu, Vertebra dan Femur meningkat (Li *et al.*, 2014). Studi yang ketiga adalah tikus berusia 6.5 bulan yang dilakukan ovariektomi pada usia 3.5 bulan dan diberikan SCI-A III 1x/minggu selama 6 minggu, Vertebra meningkat, Femur tidak diperiksa (Li *et al.*, 2011). Dan yang terakhir studi keempat, menggunakan Cynos (*Cynologous Monkeys*), berusia 9 tahun yang mulai diberikan perlakuan, 4 bulan paska ovariektomi dan diberikan romosozumab 1x/minggu selama 12 bulan, Vertebra dan Femur meningkat (Ominski *et al.*, 2015).

Sklerostin berperan dalam modulasi jaras *Wnt/β-catenin dependent* yang mulai dikenal melalui penelitian penyakit sklerosteosis dan Van Buchem, kondisi genetic langka yang berhubungan dengan kadar BMD tinggi dan berhubungan dengan penurunan resiko fraktur tulang, kedua kondisi ditelusuri dan memiliki persamaan pada mutase gene tunggal, SOST, yang terutama diekspresikan oleh osteosit. Sclerostin merupakan produk glikoprotei dari gene SOST. (McNabb *et al.*, 2016)

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa sclerostin menghambat efek katabolik tulang dengan meningkatkan produksi osteoklas melalui peningkatan ekspresi osteositik RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B*), sehingga terjadi penurunan resorpsi tulang. Beberapa penelitian lainnya menyebutkan bahwa sclerostin merupakan antagonis pada jaras sinyal Wnt. Intervensi sclerostin pada jaras Wnt adalah menyebabkan aktivitas GSK 3β terinhibisi dan fosforilasi *catenin*, sehingga translokasi ke dalam nucleus tidak dapat difasilitasi dengan baik (McNabb *et al.*, 2016)

Antibodi antisclerostin yang digunakan pada berbagai penelitian merupakan antibodi buatan turunan dari IgG1 sel hybridoma, seperti Romosozumab, Blosozumab, dan BPS804 (McNabb *et al.*, 2016). Penelitian mengenai injeksi sclerostin untuk memicu pembentukan antibodi antisclerostin, belum ditemukan sebelumnya.

Secara umum, keterbatasan penelitian ini adalah belum adanya evaluasi terhadap terbentuknya antibodi antisclerostin akibat injeksi sclerostin. Sehingga perlu adanya penelitian lain mengenai kadar anti sclerostin untuk mengetahui dosis dan lama pemberian yang tepat.

Keterbatasan yang kedua, mengenai evaluasi model osteoporosis dan atau hipoestrogen dengan ovariektomi. Seperti yang kita ketahui bahwa estrogen dapat disimpan dalam lemak, sehingga post ovariektomi, bisa saja subyek masih memiliki cadangan estrogen yang cukup untuk beberapa lama. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hanya kelompok Kontrol Positif dan kelompok yang diberikan sclerostin 1 ng yang memiliki perbedaan yang nyata. Bahkan kelompok Kontrol Negatif dan Kontrol Positif, tidak memiliki perbedaan yang bermakna. Kemungkinan yang terjadi adalah belum tercapainya kondisi

model hewan pada saat perlakuan mulai dilakukan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dipaparkan pada bab terdahulu, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Bahwa pemberian *Sclerostin* dapat menurunkan jumlah makrofag terbesar pada limpa tikus wistar model hipoestrogen dengan diberikan injeksi antigen sclerostin 1 µg + aluminium Hidroksida 100 uL.
2. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan kurang bermakna pada tikus yang diovariectomi dengan diberikan injeksi antigen sclerostin 100 ng + Aluminium Hidroksida 100 uL dibandingkan dengan kelompok tikus yang diovariectomi dengan diberikan injeksi antigen sclerostin 1 µg + Aluminium Hidroksida 100 uL.
3. Bahwa kelompok kontrol positif (tikus yang diovariectomi dan tanpa diberikan injeksi protein sclerostin) menunjukkan jumlah makrofag yang terbesar, dan kelompok tikus yang diovariectomi dengan diberikan injeksi antigen sclerostin 1 µg + aluminium Hidroksida 100 uL menunjukkan jumlah sel makrofag yang terkecil.

SARAN

1. Perlu adanya evaluasi terhadap terbentuknya antibody antisclerostin akibat injeksi sclerostin. Sehingga perlu adanya studi serial mengenai kadar anti sclerostin untuk mengetahui dosis dan lama pemberian yang tepat.
2. Perlu adanya evaluasi model osteoporosis dan atau hipoestrogen dengan ovariectomi.

3. Perlu adanya penelitian tentang jumlah makrofag dengan memakai imunohistokimia atau flowsitometri.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bruunsgaard H, Pedersen BK: Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am* 2003, 23:15-39
2. Darmawan A, Santosa S. Gambaran Kepadatan Tulang Wanita Menopause Pada Kelompok 'X' di Bandung. Vol. 2, No. 1, Juli 2002: 1-7
3. Dijkstra, NM and Papapoulos, SE. 2016. Sclerostin Inhibition in the Management of Osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 98:370–380 DOI 10.1007/s00223-016-0126-6
4. Kawiya I. Osteoporosis Patogenesis Diagnosis Dan Penanganan Terkini. Volume 10 158 Nomor 2 Mei 2009: 157-170
5. Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, Gao Y, Shalhoub V, Tipton B, Haldankar R, Chen Q, Winters A, Boone T, Geng Z, Niu QT, Ke HZ, Kostenuik PJ, Simonet WS, Lacey DL, Paszty C. 2009. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 24:578–588
6. Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Niu QT, Asuncion FJ, Barrero M, Dwyer D, Grisanti M, Stolina M, Kostenuik PJ, Simonet WS, Paszty C, Ke HZ. 2011. Increased bone formation and bone mass induced by sclerostin antibody is not affected by pretreatment or cotreatment with alendronate in osteopenic, ovariectomized rats. *Endocrinology* 152:3312–3322
7. Li X, Niu QT, Warmington KS, Asuncion FJ, Dwyer D, Grisanti M, Han CY, Stolina M, Eschenberg MJ, Kostenuik PJ, Simonet WS, Ominsky MS, Ke HZ. 2014.

- Progressive increases in bone mass and bone strength in an ovariectomized rat model of osteoporosis after 26 weeks of treatment with a sclerostin antibody. *Endocrinology* 155:4785–4797
8. McNabb, C; Patton, D; Hayes, JS. 2016. Sclerostin Antibody Therapy for the Treatment of Osteoporosis: Clinical Prospects and Challenges. Hindawi Publishing Corporation *Journal of Osteoporosis* Volume 2016, Article ID 6217286, 22 pages
 9. Mescher A.L., 2013 *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas*, 13th Edition, McGraw-Hill Education, USA, p. 239-246.
 10. Minropa A. Faktor-Faktor Yang Berhubungan Dengan Resiko Osteoporosis Pada Lansia Di Kenagarian Api-Api Wilayah Kerja Puskesmas Pasar Baru Kecamatan Bayang Kabupaten Pesisir Selatan Tahun 2013. 2013.
 11. Ominski MS, Varela A, Smith SY, Jolette J, Lesage E, Buntich S, Boyce RW. 2015. Romosozumab (sclerostin antibody) improves bone mass and strength in ovariectomized cynomologous monkeys after 12 months of treatment. *J Bone Miner Res* 30(Suppl 1):S6
 12. Petrovsky N, Aguilar J.C: Vaccine adjuvants: Current state and future trends *Immunology and Cell Biology* (2004) 82, 488–496
 13. Setyorini A, Suandi IKG, Sidiartha I, Suryawan W. Pencegahan Osteoporosis dengan Suplementasi Kalsium dan Vitamin D pada Penggunaan Kortikosteroid Jangka Panjang. Vol. 11, No. 1, Juni 2009: 32-38
 14. Silverman S. Review Article Sclerostin. Vol.2010 16 February 2010: 1-3
 15. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie M.T, Martin T.J. 1999. Modulation of Osteoclast Differentiation and Function by the New Members of the Tumor Necrosis Factor Receptor and Ligand Families *Endocrine Reviews* 20 (3): 345-357
 16. Syam Y, Noersasongko D, Sunaryo H. *Fraktur Akibat Osteoporosis*. Vol. 2, Nomor 2, Juli 2014
 17. Susanti N. *Vaksinasi Lansia Upaya Preventif Meningkatkan Imunitas Akibat Proses Penuaan*. *El-Hayah* Vol. 4, No.2 Maret 2014: 75-80
 18. Wratsangka R. *Pemberian Terapi Sulih Hormon Sebagai Upaya Meningkatkan Kesehatan Wanita Menopause*. Vol. 18, No.3 1999: 155-162
 19. Yavropoulou M, Xygonakis C, Lolou M, et al. The sclerostin story: From human genetics to the development of novel anabolic treatment for osteoporosis. 2014: 476-487
 20. Yun AJ, Lee PY: Maladaptation of the link between inflammation and boneturnover may be a key determinant of osteoporosis. *Med Hypotheses* 2004,63:532-537