

BAB VI

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 µg;

Kelompok 5: tikus yang diovariectomi dengan diberikan ajuvan (Aluminium 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

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

Hasil pengujian nilai $R^2 = 0.388$ 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 jalur sinyal Wnt. Intervensi sclerostin pada jalur Wnt adalah menyebabkan aktivitas GSK 3 β 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, Bloszumab, dan BPS804 (McNabb *et al.*, 2016). Penelitian mengenai injeksi sclerostin untuk memicu pembentukan antibody 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 ovariectomi. Seperti yang kita ketahui bahwa estrogen dapat disimpan dalam lemak, sehingga post ovariectomi, 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.