

Hasil Plagiasi Bone Remodelling

by Yuliyanasari Nurma

Submission date: 09-Nov-2018 08:35AM (UTC+0700)

Submission ID: 1035667406

File name: JURNAL_PROCEEDING_UNTUK_TEST_PLAGIASI.pdf (776.43K)

Word count: 2627

Character count: 15859

PENGARUH MELATONIN TERHADAP BONE REMODELLING

Nurma Yuliyanasari

Departemen Patologi anatomi, fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Surabaya

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menjelaskan pengaruh melatonin terhadap Bone remodeling melalui pengukuran kadar *Alkaline phosphatase* (ALP) dan *osteocalcin* yang dihasilkan oleh biakan *Bone Marrow Mesenchymal stem cells* (BM-MSCs). Penelitian ini menggunakan BM-MSC tulang femur *Rattus Norvegicus* sebagai sampel. BM-MSCs tersebut dibiakkan di medium α -Mem, didiferensiasikan dalam medium osteogenik dan diberi melatonin selama 21 hari. Penelitian ini dibagi menjadi lima kelompok yaitu kelompok K1 (melatonin 0nM), K2 (melatonin 50nM), K3 (melatonin 100nM), K4 (melatonin 500nM), dan K5 (melatonin 1000nM). BM-MSCs dikarakterisasi dengan teknik imunositokimia menggunakan marker CD45⁻ dan CD 105⁺. Kadar ALP dan *osteocalcin* diperiksa setelah hari ke-21 dengan menggunakan teknik ELISA. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar ALP antar kelompok perlakuan, yaitu antara kelompok K1 dan K2, K1 dan K3, K1 dan K4, K1 dan K5, serta K4 dan K5 ($p < 0.05$) dan terdapat perbedaan kadar *Osteocalcin* antar kelompok, yaitu antara kelompok K1 dan K2, K1 dan K3, K1 dan K4, K2 dan K4, K2 dan K5, K3 dan K4, K3 dan K5, K4 dan K5 ($p < 0.05$). Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh melatonin terhadap *Bone remodeling* melalui penurunan kadar ALP dan *osteocalcin* yang dihasilkan oleh biakan *Bone Marrow Mesenchymal stem cells* (BM-MSCs).

Kata kunci: Melatonin, BM-MSCs, Kadar ALP, Kadar *osteocalcin*, Bone remodelling

Koresponden : **Nurma Yuliyanasari**, Departemen Patologi anatomi, fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Surabaya, no telp: 082221170050, email: nurmayuliyanasari@gmail.com

I. PENDAHULUAN

Melatonin atau *N-acetyl-5-methoxytryptamine* merupakan hormon yang dihasilkan glandula pineal otak, di belakang ketiga ventrikel, dan beberapa jaringan ekstra pineal, seperti gastrointestinal dan limfosit (Brzezinski, 1997). Hormon ini bermanfaat dalam berbagai proses fisiologis tubuh, seperti irama sirkadian, sistem kekebalan, reproduksi, sebagai antioksidan sebagai antikanker, serta mengatur kesehatan tulang melalui pengaturan mekanisme pembentukan dan resorpsi tulang pada *bone remodelling* (Patti 2013; Luchetti *et al* 2014; Maria & Enderby 2014).

Bone remodeling adalah proses yang bertujuan menjaga keseimbangan resorpsi tulang oleh osteoklas dan pembentukan tulang oleh osteoblas. Proses ini terdiri dari 4 fase yaitu *activation phase*, *resorption phase*, *reverse phase*, dan *formation phase*. Pada *formation phase*, terjadi rekrutmen osteoblas dan produksi matriks tulang yang baru, osteoid, dan memicu mineralisasi. Dalam mekanisme ini peran osteoblas menjadi sangat penting. Osteoblas yang merupakan sel mononukleat dari *Mesenchymal stem cells* (MSCs) harus menjadi osteoblast yang aktif atau matur sehingga dapat menghasilkan berbagai protein penting dalam *bone remodeling* yaitu ALP, osteocalcin, osteonectin, dan *Bonesialoprotein II* (Rucci, 2008; (Neve *et al.*, 2010).)

Melatonin mampu meningkatkan kesehatan tulang dengan meningkatkan *bone remodeling* melalui peningkatan diferensiasi osteoblastik BM-MSCs melalui aktivasi jalur signal transduksi ERK 1/2 dan Wnt/ β catenin. Akan tetapi, penurunan kadar melatonin seiring terjadi dengan bertambahnya usia dan menopause, serta kebiasaan tidur dengan lampu menyala atau LAN (Light exposure at night). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian level molekuler yang membuktikan bahwa pada dosis yang tepat melatonin dapat mengurangi resiko kondisi patologis yang terjadi akibat ketidakseimbangan *bone remodeling* seperti osteoporosis (Park *et al.* 2011; Maria dan Enderby, 2014; Radio *et al* 2006; Sethi 2010)..

Penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa melatonin dosis fisiologis mampu meningkatkan aktivitas osteoblas pada biakan *Bone Marrow Mesenchymal stem cells* (BM-MSCs) di medium osteogenik yang dipapar melatonin dosis fisiologis (50nM) (Yuliyasari *et al.*, 2017). Sementara itu, rentang dosis melatonin yang diduga berpengaruh terhadap *bone remodeling* sangat bervariasi mulai fisiologis (0,1nM – 100nM) hingga farmakologis (> 100nM) (Radio *et al* 2006; Sethi 2010). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh melatonin terhadap *bone remodeling* melalui pengukuran kadar ALP dan Osteocalcin pada dosis fisiologis dan farmakologis sehingga dapat diketahui dosis yang paling efektif yang akan berpengaruh.

II. METODE

A. Isolasi, kultur dan ekspansi Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BM- MSCs)

Isolasi BM-MSc dilakukan dari tulang femur tikus putih jantan strain Wistar (*Rattus norvegicus*) usia 6-8 minggu. Setelah tikus diberikan ketamine (22-44mg/kgBB) dan diazepam (3-5mg/kgBB) intra muscular, tulang yang diisolasi dicuci dengan *saline water* dan diletakkan di *conical tube* yang berisi medium α -Mem (Sigma, USA) dan antibiotik (100units/ml penisilin G dan 100 μ g/ml streptomisin). Tulang kemudian dicuci dengan PBS (Sigma, USA, dan α -Mem kembali dan di potong. Sumsu tulang di resuspend dengan medium α -Mem 3 ml. lalu dimasukan ke dalam 3 buah *conical tube* (Corning, China) dan ditambahkan *ficoll histopaque* (Sigma, USA) 3 ml secara perlahan. Sel kemudian disentrifugasi 1600 rpm selama 30 menit. *Buffy coat* yang diperoleh diantara *ficoll histopaque* dan medium diambil dan ditambahkan medium α -Mem. Sampel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit, dan pelet hasil sentrifugasi di pindahkan ke dalam petridish 5 cm yang telah diberi medium α -Mem. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C yang mengandung CO₂ 5% agar sel yang berdekatan dapat saling menempel

MSCs yang telah diisolasi dikultur hingga mencapai 2 buah *petridish* (Corning, China) diameter 10 cm (5x pasase) dengan 90% konfluens. Sel diinkubasi pada suhu 37°C yang mengandung CO₂ 5% dan medium diganti setiap 3 atau 4 hari sekali. Setiap sel mencapai konfluens 90%, sel di pasase menggunakan tripsin (Sigma, USA) 1.5 cc.

B. Karakterisasi BM-MSCs

BM-MSCs dibuat menjadi *single cell* lalu difiksasi dengan aseton pada suhu -20°C selama 10 menit. Sampel diblok dengan 1% *Foetal cal serum* (FCS) (Sigma, USA) dan direaksikan dengan *primary antibody* dan diinkubasi selama 45 menit -1 jam. Sampel dicuci dengan PBS lalu direaksikan dengan *secondary antibody* dan diinkubasi 45 menit - 1 jam pada suhu 37°C. Sampel lalu direaksikan dengan *conjugate* Fab IgG dilabel FITC (*Fluorescence isothiocyanat*). Sampel dilihat dengan mikroskop *fluorescence* setelah 1-3 jam dengan filter *green* (Rantam 2014).

C. Diferensiasi osteogenik dan Pemberian Melatonin

Setelah sel mencapai 2 buah *petridish* diameter 10 cm (5x pasase) sel dipindahkan ke dalam 24 wellplate dan diberi medium osteogenik yang terdiri dari DMEM-HG, 10% FCS, 100nM deksametason, 0.1 μ M Asam askorbat, dan 10nM beta gliserofosfat (Lindenmair 2012). Setelah sel menempel di dinding plate, sel diberikan melatonin (Ebcam, China) sesuai dengan kelompok perlakuan. Setiap well dipilih secara random untuk dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok K1 (melatonin 0nM), K2(melatonin 50nM), K3(melatonin 100nM), K4

(melatonin 500nM), dan K5(1000 Nm). Penelitian ini dilakukan hingga 21 hari untuk memeriksa aktivitas osteoblas hasil diferensiasi BM-MSCs.

D. Konfirmasi aktivitas sel osteoblas

Aktivitas osteoblas dapat dilihat dari kadar ALP dan osteocalcin. Kedua marker tersebut dapat menunjukan keberhasilan diferensiasi dan maturasi BM-MSCs menjadi osteoblas.

Kadar ALP

Penilaian pengaruh melatonin terhadap kadar ALP dilakukan dengan *RAT ALP ELISA kit*. Pemeriksaan ini merupakan pemeriksaan *invitro quantitative* menggunakan metode ELISA(Elabscience (a) 2014).

Kadar Osteocalcin

Penilaian pengaruh melatonin terhadap kadar *osteocalcin* dilakukan dengan *RAT Osteocalcin ELISA kit*. Pemeriksaan ini merupakan pemeriksaan *invitro quantitative* menggunakan metode ELISA(Elabscience (b) 2014).

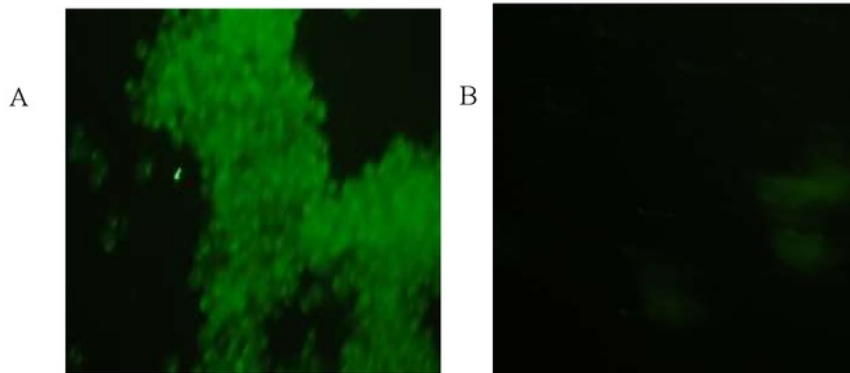
E. Analisis statistik

Hasil penelitian ini disajikan dengan nilai rata-rata \pm S.D, diperiksa normalitas, dan homogenitas data. Apabila normal, maka perbedaan statistik dianalisa dengan *one way Anova* dan apabila hasilnya $P < 0.05$ maka dilanjutkan dengan uji *pos Hoc*. Akan tetapi, jika normalitas dan homogenitas sel tidak normal maka dilakukan uji alternatif *Kruskall wallis*.

III.HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Karakterisasi BM-MSCs

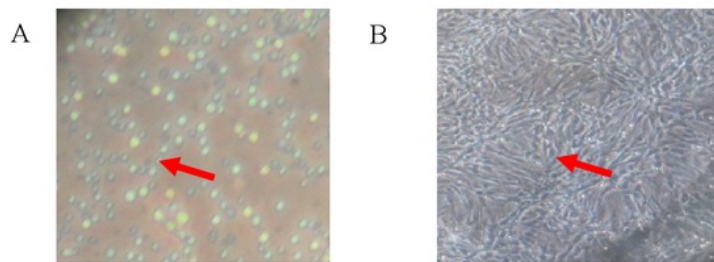
Karakterisasi *Rat* BM-MSCs dilakukan dengan pemeriksaan imunositokimia yang dilabel dengan *greenfluorescence* (FITC). Dalam penelitian ini, sel yang berlabel CD105⁺ menunjukkan warna hijau berpendar kuat, sedangkan sel yang berlabel CD45- berwarna hijau berpendar lemah.



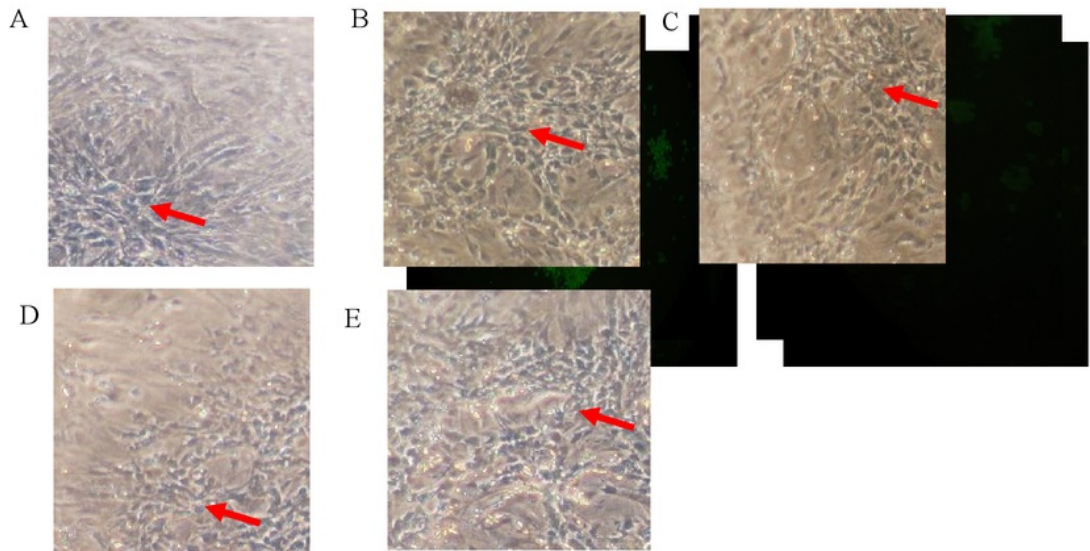
Gambar 1. Karakterisasi *Rat* BM-MSCs dengan CD105⁺ dan CD45⁻. (A) Sel berpendar hijau kuat menunjukkan berlabel CD105⁺; (B) Sel berpendar hijau lemah yang berlabel CD45⁻

B. Hasil kultur BM-MSCs

Kultur *rat* BM-MSCs dilakukan mulai dari menumbuhkan dari sel mononukleat yang diisolasi dari sumsum tulang femur tikus hingga pasase 5 di medium penumbuh α -Mem (Gambar 2). Kultur *rat* BM-MSCs kemudian dilanjutkan menggunakan medium osteogenik dan diberikan melatonin dosis 0 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM dan 1000 nM. Sel tersebut di panen setelah 21 hari. Hasilnya menunjukkan bahwa morfologi sel sudah mulai berubah, tampak mengalami diferensiasi karena sel mulai bertambah lebar dan agak kolumnar (Gambar 3). Hal tersebut menunjukkan bahwa sel telah mengalami diferensiasi osteogenik (Wang 2009). Selanjutnya, sel dipanen, dan sel pada setiap kelompok perlakuan dilisis menggunakan *ripar lysis buffer* lalu diperiksa kadar ALP dan medium kultur digunakan untuk memeriksa kadar *osteocalcin* menggunakan teknik ELISA.



Gambar 2. Perubahan morfologi BM-MSCs dengan mikroskop inverted perbesaran 10x (A) Sel mononukleat hasil isolasi dari *whole blood bonemarrow* tikus tampak bulat dan mengambang; (B) BM- MSCs setelah pasase 5 tampak gelondong, padat dan menempel satu sama lain.



Gambar 3. Morfologi *rat* BM-MSCs setelah pemberian melatonin selama 21 hari dengan mikroskop inverted dengan perbesaran 10 x Sel tampak lebar dan padat (A) Kontrol; (B) Melatonin 50 nM; (C) Melatonin 100 nM; (D) Melatonin 500 nM (E) Melatonin 1000nM

C. Kadar ALP

ALP adalah enzim yang dibutuhkan untuk proses mineralisasi tulang pada *Bone remodeling*. Ekspresi ALP diregulasi oleh sinyal transduksi ERK1/2, Runx-2, sistem osterix, dan sinyal WNT (Golub & Battaglia 2007). Kadar ALP diperoleh

dengan menggunakan Teknik ELISA dari sel yang dilisiskan dengan hasil sebagai berikut.

Tabel 1. Nilai rerata kadar ALP

Kelompok perlakuan	Jumlah sampel (N)	Rerata Kadar ALP (ng/ml)	SD
Kontrol (K1)	6	6.02	0.47
Melatonin 50nM (K2)	6	5.33	0.55
Melatonin 100nM (K3)	6	5.17	0.47
Melatonin 500nM (K4)	6	5.43	0.24
Melatonin 10000nM (K5)	6	4.92	0.3

Kadar ALP yang didapat kemudian dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk Test*. Uji normalitas menunjukkan distribusi pada semua kelompok perlakuan adalah tidak normal karena $p > 0,05$. Uji dilanjutkan dengan *Levene Test* untuk mengetahui varians data kadar ALP. Data kadar ALP memiliki varians yang sama atau homogen karena $p = 0,141$ ($p > 0,05$). Data ALP memiliki distribusi tidak normal dan varians yang normal, maka analisis perbedaan kadar ALP antar kelompok dilakukan dengan uji parametrik uji Kruskal-Wallis. Hasil uji Kruskal-Wallis menunjukkan nilai $p < 0,05$ sehingga terdapat perbedaan kadar ALP yang bermakna antara dua kelompok perlakuan. Untuk mengetahui kelompok mana yang bermakna maka dilakukan uji Mann-Whitney. Hasil analisis ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar ALP antar kelompok perlakuan.

yaitu antara kelompok K1 dan K2, K1 dan K3, K1 dan K4, K1 dan K5, serta K4 dan K5 ($p < 0.05$).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata kadar ALP pada kelompok control lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan karena pada kelompok perlakuan sel yang dikultur telah mengalami fase akhir diferensiasi sehingga telah berlangsung mekanisme deposit matriks dan telah mulai menjadi osteosit sehingga kadar ALP akan menurun (Rucci, 2008; Birmingham *et al* 2012). Melatonin diduga mampu meningkatkan diferensiasi *rat* BM-MSCs, sehingga berlangsung lebih cepat dan kadar ALP tertinggi sudah terjadi pada hari ke-14 atau sebelumnya. Dengan demikian, pada hari ke-21, *rat* BM-MSCs telah berada pada akhir fase sintesis dan mineralisasi matriks ekstraseluler, dan level ALP seluler telah mengalami penurunan (Neve *et al* 2010).

Kadar Osteocalcin

Osteocalcin yang juga dikenal sebagai *bone gamma-carboxylglutamic acid (Gla) protein* (BGP) adalah protein nonkolagen pada matriks tulang yang diregulasi oleh sinyal transduksi ERK1/2, Runx-2, sistem osterix, dan sinyal WNT yang saling berhubungan satu sama lainnya (Golub dan Battaglia, 2007). Kadar *Osteocalcin* memiliki ekspresi tertinggi pada fase terakhir diferensiasi yaitu pada hari ke 14-28 yang diikuti oleh deposisi kalsium dan fosfat (Birmingham *et al* 2012).

Kadar *osteocalcin* yang diperoleh dengan menggunakan Teknik ELISA dari medium kultur pada penelitian ini adalah sebagai berikut

Tabel 2. Nilai rerata kadar *osteocalcin*

Kelompok Perlakuan	Jumlah sampel (N)	Rerata Kadar Osteocalcin (ng/ml)	SD
Kontrol (K1)	6	1.12	0.53
Melatonin 50nM (K2)	6	8.57	2.99
Melatonin 100nM (K3)	6	6.90	0.21707
Melatonin 500nM (K4)	6	5.13	0.55543
Melatonin 1000nmM (K5)	6	1.56	2.99544

Kadar *Osteocalcin* yang didapat kemudian dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk* karena sampel yang digunakan ≤ 50 . Uji normalitas pada tabel 2 menunjukkan distribusi pada kelompok perlakuan K3 dan K4 adalah normal karena $p > 0,05$, sedangkan pada ketiga kelompok lainnya tidak normal karena $p < 0.05$. Uji dilanjutkan dengan *Levene Test* untuk mengetahui varians data kadar *Osteocalcin*. Data kadar *Osteocalcin* memiliki varians yang tidak sama atau tidak homogen pada kelompok K1, K2, K3, K4, dan K5 karena $p < 0.050$. Analisis perbedaan kadar *Osteocalcin* antar kelompok dilakukan dengan uji alternatif dari uji *One Way Anova* yaitu uji *Kruskal-Wallis*. Hasil uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai $p < 0.05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa paling tidak terdapat perbedaan kadar *Osteocalcin* yang bermakna antara dua kelompok perlakuan. Analisis data *Osteocalcin* dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui

1 kelompok mana yang berbeda. Hasilnya menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan kadar *Osteocalcin* antar kelompok 7 K1 dan K5, K2 dan K3, serta K3 dan K4 karena $p > 0.05$. Akan tetapi, terdapat perbedaan kadar *Osteocalcin* antar kelompok K1 dan K2, K1 dan K3, K1 dan K4, K2 dan K4, K2 dan K5, K3 dan K4, K3 dan K5, K4 dan K5.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa melatonin mampu meningkatkan diferensiasi *rat* BM-MSCs menjadi sel osteoblas matur yang dapat mensekresikan *osteocalcin*. Diantara kelima perlakuan tersebut, pemberian melatonin dengan dosis 50 nM dapat memberikan kadar *Osteocalcin* dengan rerata tertinggi, yaitu 8.57 ± 1.222 ng/ml. Pemberian melatonin dosis 50 nM adalah yang paling optimal dalam meningkatkan diferensiasi *rat* BM-MSCs.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang dilaporkan oleh Zaminy *et al* (2008) bahwa melatonin dengan dosis fisiologis mampu meningkatkan diferensiasi *rat* BM-MSCs menjadi osteoblas matur yang ditandai dengan peningkatan *mRNA osteocalcin*. Melatonin dosis 50 nM akan berikatan dengan reseptor melatonin di BM-MSCs kemudian meningkatkan 1 aktivitas WNT dan ERK 1/2 serta mensupresi faktor transkripsi adipogenik *CCAAT enhancer binding protein α (C/EBP α)* dan *peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)* dan menginduksi *Runt-related transcription factor (Runx-2)*, *distal-less homebox 5 (Dlx5)* dan *Osterix (Osx)* yang akan memicu diferensiasi *rat* BM-MSCs menjadi *osteoblas* aktif yang mensekresikan beberapa protein non kolagen, seperti *osteocalcin* (Radio *et al* 2006; Rucci 2008). Runx-2 akan meningkatkan transkripsi *osteocalcin* karena dapat berikatan secara langsung dengan *enhancer specific regions* gen pengkode *osteocalcin* dan mengaktifkan *osteoblastic gen* lainnya seperti BMP-2. Hasil penelitian ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Radio *et al* (2010) bahwa dosis 50 nM adalah dosis yang optimal dalam meningkatkan diferensiasi BM-MSCs menjadi osteoblas aktif.

IV. KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh pemberian melatonin terhadap *bone remodeling* melalui penurunan kadar ALP dan peningkatan kadar *osteocalcin*. Pengukuran kedua parameter tersebut dapat menjelaskan *formation phase* pada *bone remodeling*, dimana pada fase tersebut osteoblas memproduksi matriks tulang yang baru, osteoid, dan memicu mineralisasi.

DAFTAR PUSTAKA

1 Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP, Mcnamara LM. 2012. Osteogenic Differentiation Of Mesenchymal Stem Cells Is Regulated By Osteocyte And Osteoblast Cells In A Simplified Bone Niche. *European Cells And Materials*, vol. 23, pp. 13-27

Elabscience (a) (2014). Rat ALP (Alkaline Phosphatase) ELISA Kit 5 th Edition. Elabscience Biotechnology Co, Ltd. www.elabscience.com

1
Elabscience (b) (2014). Rat OC/BGP (Osteocalcin) ELISA Kit 5 th Edition. Elabscience Biothechnology Co, Ltd. www.elabscience.com.

1
Golub EE, Battaglia KB. 2007. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop*, pp. 444 - 448.

1
Maria S, Enderby PAW. 2014. Melatonin effects on bone: potential use for the prevention and treatment for osteopenia, osteoporosis, and periodontal disease and for use in bone-grafting procedures. *J.Pineal Res*, vol.56, pp: 115-125.

Radio NM.; Doctor JS, Enderby PAW. 2006. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK1/2 signaling cascade. *J. Pineal Res*, vol.40, pp. 332–342.

Rantam FA, Ferdiansyah, dan Purwati. 2014. *Stem Cell; Mesenchymal, Hematopoetik dan Model Aplikasi Edisi Kedua*. Surabaya: Airlangga University Press, pp. 23-40.

Rucci, N. 2009. Molecular biology of bone remodeling. *Clinical Case in Mineral and Bone Metabolism*, vol.5, no.1, pp. 49-56.

1
Sethi S, Radio NM, Kotlarczyk MP, Chen CT, Wei YH, Jockers R, dan Enderby PAW. 2010. Determination of the minimal melatonin exposure required to induce osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells and these effects on downstream signaling pathways. *J.Pineal Res*, vol. 49, pp. 222-238.

1
Yuliyanasari N, Mastutik G, Putra St. 2017. The Elevation Of Osteoblast Activity In Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells In Osteogenic Medium Exposed With Melatonin In Physiological DOSES. *Folia Medica Indonesiana*, vol. 53, pp.41-48.

Hasil Plagiasi Bone Remodelling

ORIGINALITY REPORT

18%	%	4%	20%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to Universitas Muhammadiyah Ponorogo	18%
	Student Paper	
2	Submitted to Universitas Muhammadiyah Surakarta	1%
	Student Paper	

Exclude quotes On

Exclude matches < 20 words

Exclude bibliography On