

PENGARUH MELATONIN TERHADAP BONE REMODELLING

Nurma Yulianasari

Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Surabaya

Korespondensi: nurmayuliyanasari@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menjelaskan pengaruh melatonin terhadap Bone remodeling melalui pengukuran kadar Alkalin 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 0 nM), K2 (melatonin 50 nM), K3 (melatonin 100 nM), K4 (melatonin 500 nM), 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).

Keywords: Melatonin, BM-MSCs, Kadar ALP, Kadar osteocalcin, Bone remodelling

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 & Enderby2014).

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 (Ligthexposure at night). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian level molekuler yang membuktikan bahwa pada dosis yang tepat melatonin dapat mengurasi 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) (Yuliyanasari 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.

METODE

Isolasi, kultur dan ekspansi Bone Marrow Mesenkimal 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 100µg/ml streptomisin). Tulang kemudian dicuci dengan PBS (Sigma, USA, dan α-Mem kembali dan di potong. Sumsum tulang di resuspensi 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 senstrifugasi di pindahkan ke dalam petridish 5 cm yang telah diberi medium α-Mem. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37oC 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 37oC 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.

Karakterisasi BM-MSCs

BM-MSCs dibuat menjadi singe cell lalu difiksasi dengan aseton pada suhu -20oC selama 10 menit. Sampel diblok dengan 1% Foetal calcs serum (FCS) (Sigma, USA) dan direaksikan dengan primary antibodi dan diinkubasi selama 45 menit -1 jam. Sampel dicuci dengan PBS lalu direaksikan dengan secondary antibodi dan diinkubasi 45 menit – 1 jam pada suhu 37oC. Sampel lalu direaksikan dengan conjugate Fab IgG dilabel FITC (Fluorescence isothiocyant). Sampel dilihat dengan mikroskop fluorensence setelah 1-3 jam dengan filter green (Rantam 2014).

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 dari DMEM-HG, 10% FCS, 100nM deksametason, 0.1µM 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 0 nM), K2 (melatonin 50 nM), K3 (melatonin 100 nM), K4 (melatonin 500 nM), dan

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

Konfirmasi aktivitas sel osteoblas

Aktivitas osteoblas dapat dilihat dari kadar ALP dan osteocalcin. Kedua marker tersebut dapat menunjukkan 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).

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 $P < 0.05$

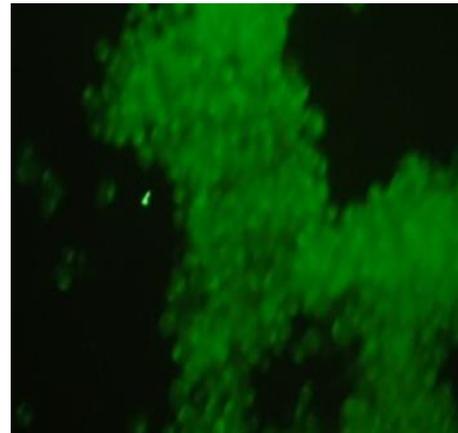
maka dilanjutkan dengan uji pos Hoc. Akan tetapi, jika normalitas dan homogenitas sel tidak normal maka dilakukan uji alternatif Kruskall wallis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

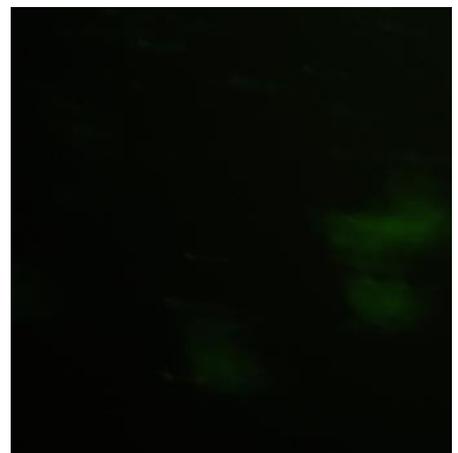
Hasil Karakterisasi BM-MSCs

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.

A



B

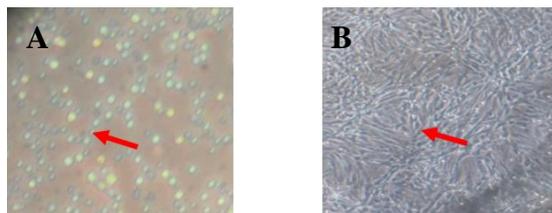


Gambar 1. Karakterisasi Rat BM-MSCs

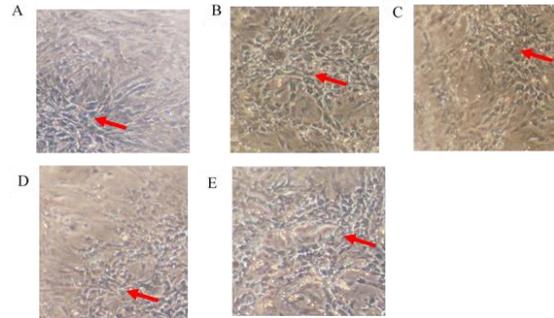
dengan CD105+ dan CD45-. (A) Sel berpendar hijau kuat menunjukkan berlabel CD105+; (B) Sel berpendar hijau lemah yang berlabel CD45-

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 dilisiskan menggunakan ripa 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 bone marrow 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

Kadar ALP

ALP adalah enzim yang dibutuhkan untuk proses mineralisasi tulang pada Bone remodeling . Ekspresi ALP diregulasi oleh sinyal transduksi ERK1/2, Runx- 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-carboxyglutamic 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	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 kelompok mana yang berbeda. Hasilnya menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan

kadar Osteocalcin antar kelompok 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 aktivitas WNT dan ERK 1/2 serta mensupresi faktor transkripsi adipogenik CCAAT enhancer binding protein α (C/EBP α) dan peroxisome proliferasi-activated receptor

γ (PPAR γ) dan menginduksi Runt-related transcription factor (Runx-2), distal-less homeobox 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.

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
2. Elabscience (a) (2014). Rat ALP (Alkaline Phosphatase) ELISA Kit 5 th Edition. Elabscience Biothechnology Co, Ltd. www.elabscience.com
3. Elabscience (b) (2014). Rat OC/BGP (Osteocalcin) ELISA Kit 5 th Edition. Elabscience Biothechnology Co, Ltd. www.elabscience.com.
4. Golub EE, Battaglia KB. 2007. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop*, pp. 444 - 448.
5. 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.
6. 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.
7. Rantam FA, Ferdiansyah, dan Purwati. 2014. *Stem Cell; Mesenchymal, Hematopoetik dan Model Aplikasi Edisi Kedua*. Surabaya: Airlangga University Press, pp. 23-40.
 8. Rucci, N. 2009. Molecular biology of bone remodeling. *Clinical Case in Mineral and Bone Metabolism*, vol.5, no.1, pp. 49-56.
 9. 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.
 10. 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.