

Pengaruh Induksi *Cathepsin K* terhadap Pembentukan Immunoglobulin (IgG) Anti-*Cathepsin K*, Osteosit, dan Kadar *Alkaline Phosphatase* (ALP) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Betina Galur Wistar Pascaovarietomi

Fransisco Wahyu Santoso*, Arif Ismail*, Oktavia Rahayu Adianingsih**, Yurike Mandrasari*

*Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

**Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Korespondensi: oktavia.rahayu92@gmail.com

ABSTRAK

Osteoporosis adalah suatu "silent disease" yang dapat melemahkan tulang dan menyebabkan fraktur. Dua dari lima penduduk Indonesia berisiko terkena osteoporosis dan diperkirakan pada tahun 2025 angka tersebut meningkat tiga kali lipat. Saat ini telah ditemukan obat-obatan yang berfungsi sebagai inhibitor *cathepsin K* yang menunjukkan potensi besar dalam menurunkan tingkat osteoporosis. *Cathepsin K* berperan penting dalam destruksi jaringan, *remodelling*, dan merusak kartilago tulang. Penelitian ini ditujukan untuk membuktikan pengaruh pemberian kandidat vaksin berbasis dasar *cathepsin K* terhadap penurunan kecepatan resorpsi tulang pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang diovariectomi. Tikus putih Wistar betina berusia 10-12 minggu dikelompokkan menjadi 5 kelompok: kontrol (-), kontrol (+) yang diovariectomi, kelompok perlakuan yang diovariectomi dan diberikan *cathepsin K* 50ng/200 µL, 100 ng /200 µL, dan 200 ng/200 µL. Pembedahan dilakukan pada hari ke-30 dan dilakukan pengukuran titer IgG anti-*cathepsin K*, penghitungan jumlah osteosit, dan pengukuran kadar ALP serum. Uji ANOVA menunjukkan bahwa pemberian kandidat vaksin *cathepsin K* yang ditambahkan dengan CFA-IFA secara bermakna meningkatkan titer IgG anti-*cathepsin K* dalam serum ($p=0,00$). Pemberian *cathepsin K* dosis 50ng/200 µL, 100 ng /200 µL, dan 200 ng/200 µL tidak mengurangi jumlah osteosit secara bermakna. Pemberian *cathepsin K* dosis 50ng/200 µL, 100 ng /200 µL, dan 200 ng/200 µL tidak meningkatkan ALP serum ($p>0,05$) secara bermakna. Kesimpulan penelitian adalah bahwa pemberian kandidat vaksin *cathepsin K* dapat meningkatkan titer IgG anti-*cathepsin K* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang diovariectomi, tetapi tidak berpengaruh secara bermakna terhadap jumlah osteosit dan kadar ALP serum. Oleh karena itu, kandidat vaksin osteoporosis dengan bahan dasar *cathepsin K* masih perlu diteliti dan dikembangkan lebih lanjut.

Kata kunci: Osteoporosis, *cathepsin K*, IgG anti-*cathepsin K*, osteosit, ALP

ABSTRACT

Osteoporosis is a "silent disease" that can weaken bones and cause fractures. Two from five of Indonesia's population at risk of osteoporosis and it is estimated in 2025 that number will become tripled. It has been found a kind of drug, that serves as *cathepsin K* inhibitors, that shows great potential in reducing osteoporosis. *Cathepsin K* has an important role in tissue destruction, bone remodeling, and cartilage destruction. This study is aimed to verify the effect of the *cathepsin K* vaccine candidate to the decrease of bone resorption in *Rattus norvegicus* strain wistar post-ovariectomy. *Female Rattus norvegicus Strain Wistar* (age: 10-12 weeks) are divided into 5 groups: control (-), control (+) with ovariectomy, the treatment groups are ovariectomized and given *cathepsin K* 50 ng/200 µL, 100 ng /200 µL, and 200 ng/200 µL. Surgery perform on the 30th day and then IgG titers of anti-*cathepsin K* and ALP serum level are measured and the number of osteocytes is counted. ANOVA test shows that the administration of the vaccine candidate, *cathepsin K* that are added with CFA-IFA, is significantly increase the titers of IgG anti-*cathepsin K* in the serum ($p = 0.00$). The administration of *cathepsin K* 50 ng/200 µL, 100 ng /200 µL, and 200 ng/200 µL do not significantly reduce the number of osteocytes. The administration of *cathepsin K* 50 ng/200 µL, 100 ng / 200 µL, and 200 ng/200 µL do not increase the ALP serum levels ($p > 0.05$) significantly. The conclusion of the study is that the administration of the *cathepsin K* vaccine candidate can increase the IgG anti-*cathepsin K* titers in *Female Rattus norvegicus Strain Wistar Rats Post-ovariectomy*, but do not significantly affect the number of osteocytes and ALP serum levels. Therefore, the osteoporosis vaccine candidate with *cathepsin K* as a basic material still need to be researched and developed.

Keywords: Osteoporosis, *cathepsin K*, IgG anti-*cathepsin K*, osteocyte, ALP

PENDAHULUAN

Menopause adalah keadaan di mana ovarium telah kehilangan fungsi fisiologisnya dan dapat ditemui pada saat berakhirnya menstruasi selama 12 bulan berturut-turut tanpa alasan yang jelas. Menopause terjadi pada wanita yang berusia 47-53 tahun yang ditandai dengan menurunnya produksi estrogen dan progesteron, serta peningkatan *Follicle-Stimulating Hormone* (FSH) dan *Lutenizing Hormone* (LH). Menurunnya produksi estrogen pada wanita menopause menjadi salah satu faktor risiko terjadinya osteoporosis.¹

World Health Organization (WHO), menyebutkan bahwa osteoporosis adalah suatu keadaan di mana kondisi kepadatan tulang di bawah atau sama dengan standar deviasi 2,5 *Bone Mineral Density* (BMD). Osteoporosis merupakan “*silent disease*” yang dapat melemahkan tulang dan cenderung menyebabkan fraktur.² Di Indonesia, hasil analisa data risiko osteoporosis pada tahun 2005 dengan jumlah sampel 65.727 orang (22.799 laki-laki dan 42.928 perempuan) yang dilakukan oleh Puslitbang Gizi Depkes RI menunjukkan angka prevalensi osteopenia (osteoporosis dini) sebesar 41,7% dan prevalensi osteoporosis sebesar 10,3%. Ini menunjukkan 2 dari 5 penduduk Indonesia memiliki risiko untuk terkena osteoporosis, yakni 41,2% dari keseluruhan sampel yang berusia kurang dari 55 tahun terdeteksi menderita osteopenia. Fraktur tulang panggul merupakan konsekuensi tersering akibat osteoporosis. Dilaporkan pada tahun 1990, jumlah fraktur tulang panggul yang terjadi akibat osteoporosis mencapai angka 1,7 juta dan diestimasikan pada tahun 2025 angka tersebut meningkat tiga kali lipat.³

Terapi utama untuk penanganan osteoporosis karena menopause ini adalah dengan *Hormone Replacement Therapy* (HRT). Namun, terapi ini dapat meningkatkan risiko terjadinya berbagai macam penyakit seperti kanker payudara, penyakit jantung koroner, stroke dan

emboli paru.⁴ Dari beberapa kasus tersebut dapat disimpulkan bahwa solusi yang tepat untuk mengatasi osteoporosis belum memuaskan.

Osteoporosis ditandai dengan penurunan pembentukan tulang dengan peningkatan resorpsi tulang yang diperankan oleh osteoklas. *Cathepsin K* merupakan protein aktif terbanyak dan marker paling sensitif dalam proses resorpsi oleh osteoklas serta memiliki peran kunci dalam perusakan jaringan, *remodelling*, dan pemecahan kartilago tulang. Obat-obatan yang berfungsi sebagai inhibitor *cathepsin K* seperti Odanacatib/MK0822 menunjukkan potensi yang sangat besar dalam menurunkan tingkat osteoporosis.⁵ Selain itu, menurut penelitian Drake dan kawan-kawan, enzim *cathepsin K* hanya diekspresikan oleh osteoklas.⁶ Paradigma vaksinasi saat ini hanya terbatas pada penyakit-penyakit infeksi saja, namun beberapa penelitian terkini menunjukkan bahwa pembentukan antibodi terhadap suatu target tertentu memiliki potensi yang besar sebagai strategi pencegahan penyakit-penyakit degeneratif. Dalam penelitian ini dibentuk desain pencegahan osteoporosis berbasis vaksinasi melalui induksi anti-*cathepsin K* pada tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) betina galur wistar pascaovarietomi.

METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu antigen *cathepsin K*, adjuvant (CFA-IFA), *deionized water*, ketamin, povidon iodine (*betadine solution*), alkohol 70%, basitrasin serbuk (Nebacetin), gentamisin injeksi, novalgin injeksi, PBS, BSA 1%, tween, Surblu TMB, antibodi *cathepsin K*, antibodi sekunder, *coating buffer*, HCL 1 N, eter, formalin 10%, asam format 8%, alkohol 30%, 50%, 70%, 80%, absolut 96%, aquades, larutan Harris Hemaktosilin, larutan Eosin (HE).

Subjek / Hewan Coba

Sampel penelitian adalah model tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina galur Wistar, berusia 2-3 bulan, berat badan 150-200 gram. Tikus disimpan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan 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.⁷ Tikus dibagi menjadi 5 kelompok (5 tikus/kelompok). Kelompok 1 merupakan kelompok kontrol negatif (tikus yang tidak diinduksi ovariektomi dan tanpa diberikan vaksinasi), kelompok 2 merupakan kelompok kontrol positif (tikus yang diinduksi ovariektomi dan tanpa diberikan vaksinasi), kelompok 3,4,5 merupakan kelompok tikus yang diinduksi ovariektomi dan diberikan vaksinasi dengan dosis yang berbeda-beda, yaitu vaksin antigen *cathepsin K* 50 ng, 100ng dan 200ng dengan penambahan adjuvant CFA-IFA 100 µL/injeksi.

Perawatan Tikus

Tikus *Rattus norvegicus* dipelihara di kandang yang terbuat dari bak plastik dengan tutup kandang dibuat dari anyaman kawat. Sebelum dilakukan ovariektomi, tikus terlebih dahulu ditimbang dengan neraca Sartorius.

Induksi Ovariektomi

Tikus difiksasi dalam posisi supinasi, kemudian dilakukan anestesi menggunakan ketamin intramuskular (IM) dengan dosis 40 mg/kgBB. Bulu abdomen dicukur, lalu dilakukan desinfeksi dengan alkohol 70% dan larutan betadin. Setelah itu ditutupi dengan steril. Dilakukan insisi transabdominal kira-kira di atas uterus sepanjang 1,5-2 cm. Selanjutnya

oviduk bagian distal dan ovarium diligasi, kemudian oviduk dan ovarium diangkat. Luka potongan diberi basitrasin serbuk (Nebacetin). Prosedur yang sama dilakukan untuk ovarium kiri dan kanan. Luka insisi dijahit dengan catgut, kemudian diolesi povidon iodine dan Nebacetin, lalu ditutupi kasa steril. Kemudian diberikan Gentamycin IM dengan dosis 60-80 mg/kgBB 1 kali per hari selama 3 hari dan Novalgin IM dengan dosis 0,3 ml selama 1 hari.⁷

Pembuatan Vaksin *Cathepsin K*

Konjugasi dan *coupling* protein karier dimulai dengan menambahkan 2 mg KLH yang terlyophilisasi ke dalam 200 µL buffer konjugasi. Lalu larutkan 2 mg peptida atau hapten dalam 500 µL dari buffer konjugasi tersebut. Kemudian tambahkan 500 µL cairan peptida 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 peptida-karier.⁸

Injeksi Vaksin *Cathepsin K*

Vaksin diinjeksikan secara intraperitoneal (*cathepsin K* + CFA-IFA 100 µL ip). CFA diberikan pada saat injeksi pertama, sedangkan IFA diinjeksikan sebagai booster setiap 2 minggu sekali sebanyak 2 kali booster.

Pengukuran Titer Antibodi Anti-*Cathepsin K*

Pengukuran titer antibodi anti-*cathepsin K* dengan ELISA. Antigen didilusi dalam *coating buffer* (50 µL/well) (1:1), tutup *plate* dan inkubasi pada suhu 4°C semalam. Cuci *plate* 3x dengan PBS 50 µL. Blok *protein-binding site* dalam *coated well* dengan menambahkan 50 µL *blocking buffer*, 5% non fat dry milk atau 5% serum (BSA) dalam PBS untuk tiap *well*, tutup *plate* dengan plastik dan inkubasi 2 jam pada suhu ruang. Cuci *plate* dengan PBS-Tween 3x3 menit. Tambahkan 50 µL serum (antibodi primer) untuk setiap *well*, tutup *plate* dengan

plastik dan inkubasi 2 jam pada suhu ruang. Cuci plate dengan PBS-Tween 3x3 menit. Tambahkan 50 μ L antibodi sekunder terkonjugasi (*anti-mouse biotin conjugate*), tutup plate dengan plastik dan inkubasi 1-2 jam pada suhu ruang. Cuci plate dengan PBS-Tween 3x3 menit. Tambahkan enzim SA-HRP, inkubasi 1 jam pada suhu ruang. Tambahkan 50 μ L *substrat solution* untuk tiap well. Setelah muncul warna, tambahkan 50 μ L *stop solution* tiap well. Baca *optical density* dengan ELISA reader ($\lambda=450\text{nm}$).

Pengukuran Jumlah Osteosit

Tikus dieutanasia dengan menggunakan eter. Dilakukan pemotongan pada bagian *Proximal Tibial Metaphyses* (PTM), kemudian tulang PTM tikus dimasukkan ke dalam botol tertutup berisi formalin 10%.⁹Jaringan tulang dilakukan dekalsifikasi dengan cara direndam di dalam asam format 8%. Setelah lunak, tulang direndam dalam air mineral. Dilakukan dehidrasi dengan merendam pada alkohol bertingkat. Dilakukan *clearing* dengan xylol, kemudian dilakukan proses infiltrasi dengan parafin. Dilakukan *blocking* dengan parafin cair dingin, selanjutnya dilakukan pemotongan blok parafin dengan menggunakan mikrotom. Hasil sayatan blok parafin dipasang pada gelas obyek, dan kemudian dilakukan deparafinasi. Sampel yang telah dipotong diletakkan di atas gelas obyek. Kemudian dilakukan rehidrasi dengan alkohol bertingkat. Tetesi dengan Harris Hematoksin, cuci dengan alkohol bertingkat. Tetesi dengan Eosin, cuci dengan alkohol bertingkat, bilas dengan akuades, keringkan. Kemudian bilas dengan air mengalir, keringkan. Tetesi dengan emelian dan tutup dengan *coverslip*.⁹Slide tulang hasil pemeriksaan HE diperiksa menggunakan program *Scan Dot Slide OlyVIA*. Kemudian jumlah osteosit dihitung dengan pembesaran 20x obyektif pada tiap slide dari masing-masing tikus sebanyak 20 lapang pandang kemudian dirata-rata.¹⁰

Pengukuran Kadar ALP

Pada saat dilakukan pembedahan, serum tikus diambil dengan menggunakan spuit 5 cc. Kemudian serum ditempatkan pada tabung epenmayer yang telah diberi label sesuai perlakuan masing-masing. Kemudian serum dibawa ke Instalasi Laboratorium Sentral Patologi Klinik RSSA Malang. Kemudian kadar ALP diukur dengan menggunakan *autoanalyzer* spektrofotometri.

Analisis Statistik

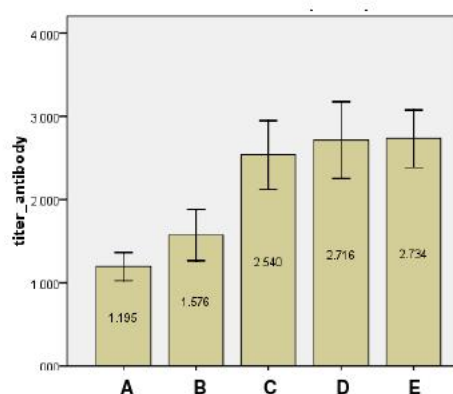
Hasil pengukuran tikus kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *SPSS 16,0 for Windows XP* dengan tingkat kebermaknaan 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif dan korelatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *One-way ANOVA* dan *Post hoc test*.¹¹

HASIL

Hasil Pengukuran Titer anti-Cathepsin K (IgG) Serum dengan ELISA

Tabel 1. Titer anti-cathepsin K serum tikus

Kelompok	Rerata (SD) Titer Ab Cathepsin K
A. Kontrol (-)	1,195 (0,170)
B. Kontrol (+)	1,576 (0,309)
C. Cathepsin K 50 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L	2,540 (0,414)
D. Cathepsin K 100 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L	2,716 (0,460)
E. Cathepsin K 200 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L	2,734 (0,344)

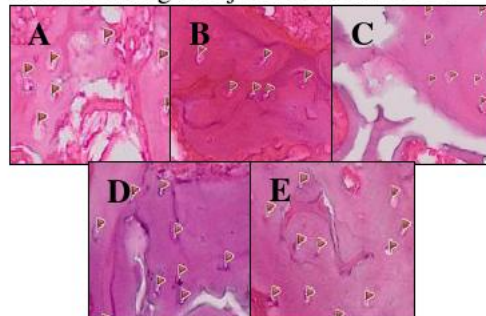


Gambar 1. Titer anti-*cathepsin K* serum tikus Tabel 1 dan Gambar 1 menunjukkan rerata titer antibodi anti-*cathepsin K* pada serum tikus yang diperiksa dengan ELISA. Dapat dilihat bahwa pada kelompok A (kontrol -) didapatkan rerata titer anti-*cathepsin K* adalah 1,195 dan SD 0,170. Pada kelompok B (kontrol +) yaitu kelompok tikus yang sudah diinduksi ovariektomi didapatkan rerata titer anti-*cathepsin K* adalah 1,576 dan SD 0,309. Dengan pemberian *cathepsin K* 50 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L pada kelompok perlakuan C didapatkan peningkatan rerata titer anti-*cathepsin K* menjadi 2,540 dan SD 0,414. Kemudian dengan pemberian *cathepsin K* 100 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L pada kelompok perlakuan D didapatkan peningkatan rerata titer anti-*cathepsin K* menjadi 2,716 dan SD 0,460. Sedangkan dengan pemberian *cathepsin K* 200 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L pada kelompok perlakuan E didapatkan peningkatan rerata titer anti-*cathepsin K* menjadi 2,734 dan SD 0,344.

Uji ANOVA didapatkan nilai $p=0,00$ ($p<0,05$) antar kelompok. Uji *post hoc Tukey* menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol (kelompok 1 dan 2) dengan kelompok perlakuan yang diberikan vaksin *cathepsin K* berbagai dosis (kelompok 3, 4 dan 5) ($p=0,00$). Perbedaan dosis pada kelompok 3, 4 dan 5 tidak menunjukkan perbedaan pengaruh yang bermakna ($p>0,05$).

Hasil Penghitungan Jumlah Osteosit dalam Matriks Tulang

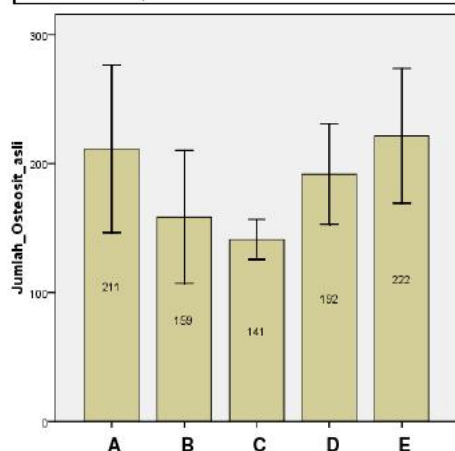
Pada pengecatan HE dan menggunakan program *Scan Dot Slide OlyVIA* dengan perbesaran 20x obyektif dapat dihitung jumlah osteosit dalam matriks tulang. Dapat dilihat bahwa pada kelompok A (kontrol -) didapatkan rerata jumlah osteosit dalam matriks tulang adalah 211 dan SD 64. Pada kelompok B (kontrol +) yaitu kelompok tikus yang sudah diinduksi ovariektomi didapatkan rerata jumlah osteosit dalam matriks tulang adalah 159 dan SD 51. Dengan pemberian *cathepsin K* 50 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L pada kelompok perlakuan C didapatkan peningkatan rerata jumlah osteosit dalam matriks tulang menjadi 141 dan SD 15. Kemudian dengan pemberian *cathepsin K* 100 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L pada kelompok perlakuan D didapatkan peningkatan rerata jumlah osteosit dalam matriks tulang menjadi 192 dan SD 39. Sedangkan dengan pemberian *cathepsin K* 200 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L pada kelompok perlakuan E didapatkan peningkatan rerata jumlah osteosit dalam matriks tulang menjadi 222 dan SD 52.



Gambar 2. Osteosit dalam matriks tulang PTM yang dicat dengan pewarnaan HE menggunakan program *Scan Dot Slide OlyVIA* dengan perbesaran 20x obyektif. (A. Kontrol (-); B. Kontrol (+); C. *Cathepsin K* 50 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L; D. *Cathepsin K* 100 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L; E. *Cathepsin K* 200 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L)

Tabel 2. Jumlah osteosit dalam matriks tulang

Kelompok	Rerata (SD) Jumlah Osteosit
A. Kontrol (-)	211 (64)
B. Kontrol (+)	159 (51)
C. <i>Cathepsin K</i> 50 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L	141 (15)
D. <i>Cathepsin K</i> 100 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L	192 (39)
E. <i>Cathepsin K</i> 200 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L	222 (52)

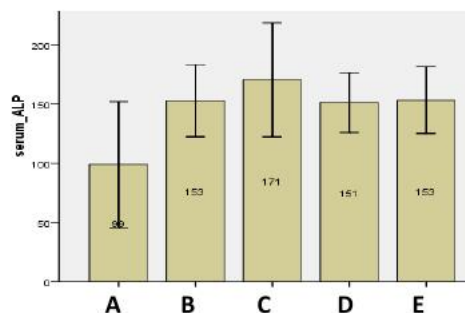
**Gambar 3.** Jumlah osteosit dalam matriks tulang

Uji ANOVA didapatkan nilai $p=0,230$ ($p>0,05$) pada data jumlah osteosit. Uji *post hoc* Tukey tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok 1, 2, 3, 4, dan 5 ($p>0,05$). **Hasil pengukuran kadar ALP dalam serum tikus**

Tabel 3. Kadar ALP serum tikus

Kelompok	Rerata (SD) Kadar ALP Serum
A. Kontrol (-)	99,00 (53,25)
B. Kontrol (+)	153,00 (30,46)
C. <i>Cathepsin K</i> 50 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L	170,60 (48,12)
D. <i>Cathepsin K</i> 100 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L	151,40 (25,38)

E. *Cathepsin K* 200 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L 153,40 (28,15)

**Gambar 4.** Kadar ALP serum

Dari tabel 3 dan gambar 4 dapat dilihat bahwa pada kelompok A (kontrol -) didapatkan rerata kadar ALP dalam serum tikus 99,00 dan SD 53,25. Pada kelompok B (kontrol +), tikus yang sudah dilakukan ovariectomi, didapatkan rerata kadar ALP serum 153,00 dan SD 30,46. Dengan pemberian *cathepsin K* 50 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L pada kelompok perlakuan C didapatkan peningkatan rerata kadar ALP serum 170,60 dan SD 48,12. Kemudian dengan pemberian *cathepsin K* 100 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L pada kelompok perlakuan D didapatkan penurunan rerata kadar ALP serum menjadi 151,40 dan SD 25,38. Sedangkan dengan pemberian *cathepsin K* 200 ng/200 μ L + CFA-IFA 100 μ L pada kelompok perlakuan E didapatkan rerata kadar ALP serum menjadi 153,40 dan SD 28,15.

Uji ANOVA didapatkan nilai $p=0,080$ ($p>0,05$) pada data kadar ALP. Uji *post hoc* Tukey tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok 1, 2, 3, 4, dan 5 ($p>0,05$).

PEMBAHASAN

Efektifitas Pemberian Kandidat Vaksin *Cathepsin-K* dalam Menginduksi Terbentuknya IgG Anti-*Cathepsin K*

Pada penelitian ini, pemberian *cathepsin K* yang ditambahkan dengan CFA-IFA dapat meningkatkan ekspresi anti-*cathepsin K* secara bermakna ($p=0,000$). Hasil penelitian ini

membuktikan bahwa *cathepsin K* yang ditambahkan dengan CFA-IFA direspons oleh sel T CD4⁺ yang kemudian menginduksi terbentuknya antibodi spesifik terhadap *cathepsin K*. Pemberian dosis *cathepsin K* 50 ng/200 µL, 100 ng/200 µL maupun 200 ng/200 µL tidak menimbulkan perbedaan yang bermakna, hal ini mungkin dikarenakan respons imun berupa sekresi antibodi tidak bergantung pada dosis. Dosis dalam batas tertentu mampu menginduksi terbentuknya antibodi, namun jika dosis terlalu besar ataupun terlalu kecil justru akan menimbulkan kondisi *immunotolerance*. Adjuvan adalah suatu bahan vaksin yang digunakan untuk menjaga integritas antigen, meningkatkan respons imun terhadap antigen, dan mencegah terjadinya toleransi terhadap suatu antigen vaksin.¹²

Efektifitas Pemberian Vaksin terhadap Penurunan Degradasi Tulang

Penelitian Troendkk.membuktikan bahwa isolasi *cathepsin K* pada osteoklas dapat menghambat gangguan resorpsi tulang secara *in vitro*. Inhibitor spesifik *cathepsin K* dapat menurunkan resorpsi tulang dan juga secara bermakna menurunkan resorpsi tulang *in vivo*.¹³

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, *cathepsin K* merupakan faktor penting dalam proses degradasi tulang pada osteoporosis. *Cathepsin K* adalah suatu enzim yang disekresikan oleh osteoklas, yang kaya akan asam amino sistein protease. Enzim ini memegang peranan penting dalam destruksi jaringan, *remodelling*, dan perusakan kartilago pada tulang.¹⁴ *Cathepsin K* diidentifikasi sebagai protease penting pada osteoklas yang mementarai proses resorpsi tulang dan degradasi kartilago serta membutuhkan lingkungan yang asam agar dapat mendegradasi kolagen ekstraseluler.¹⁵ Enzim ini juga memiliki peran penting pada homeostasis paru dan proteolysis thyroglobulin.^{16,17} dan dikenal sebagai *new kinin degrading peptidase*.^{8,18} *Cathepsin K*, yang terekspresi

dalam osteoklas, merupakan enzim *elastolytic* yang poten dengan aktifitas *collagenolytic* yang unik.¹⁹ *Cathepsin K* mendegradasi collagen tipe I dan II dalam *cross-linked triple helices* secara kovalen.²⁰⁻²³ Aktifitas resorpsi tulang oleh osteoklas merupakan sebuah bagian esensial dari proses *remodelling* dan terjadi sebagai respon terhadap *micro-environment* tulang.²⁴

Efektivitas Pemberian Vaksin terhadap Peningkatan Kadar ALP Serum

Penggunaan *cathepsin K* sebagai bahan vaksin untuk mencegah osteoporosis tidak mempengaruhi proses pembentukan tulang yang ditandai dengan hasil pemeriksaan kadar ALP dalam serum tikus dan penghitungan jumlah osteosit yang tidak signifikan antar kelompok ($p>0,05$). Harapannya penelitian ini dapat dilanjutkan untuk dapat dikembangkan menjadi kandidat vaksin osteoporosis mutakhir.

Potensi Penggunaan Vaksin *Cathepsin K* pada Manusia

Penelitian ini membuktikan pemberian *cathepsin K* sebagai bahan dasar vaksin dapat menurunkan degradasi tulang dalam proses terjadinya osteoporosis. Oleh karena itu, kandidat vaksin ini berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut. Rencana jangka panjang dari penelitian ini adalah pengujian preklinis lainnya dan nantinya dilanjutkan penelitian pada manusia dan diproduksi luas. Untuk mencapai tingkat pengujian pada manusia, perlu dilakukan penelitian mengenai keefektifan vaksin dan efek samping yang ditimbulkan.

Metode pemberian vaksin pada manusia akan dengan metode pada hewan coba. Setelah program vaksinasi selesai, diharapkan tubuh telah memproduksi sel memori yang selanjutnya memproduksi antibodi protektif terhadap osteoporosis. Target pemberian vaksin osteoporosis ini adalah wanita dengan kriteria kondisi *post-*

menopause. Pemilihan potensial target ini berdasarkan mula terjadinya penurunan aktifitas dan produksi osteoblas dan peningkatan produksi serta aktifitas osteoklas yang terjadi karena penurunan produksi estrogen.

Efek Samping Pemberian Vaksin

Efek samping yang mungkin terjadi karena pemberian vaksin antara lain adalah terjadinya demam setelah pemberian vaksin. Selain itu juga sering terjadi pembengkakan pada tempat injeksi. Selain efek samping jangka pendek tersebut, berdasarkan studi epidemiologi oleh King terdapat hubungan efek samping jangka panjang antara pemberian vaksin secara umum dengan penyakit-penyakit kronis. Penyakit-penyakit seperti asma, *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD), diabetes, gangguan perkembangan otak dan perilaku termasuk autisme. Meskipun demikian masih dibutuhkan penelitian untuk membuktikan bahwa penyakit-penyakit tersebut benar-benar merupakan efek samping yang ditimbulkan dari vaksin tanpa terpengaruh faktor lain seperti lingkungan dan genetik.²⁴

KESIMPULAN

Pemberian kandidat vaksin *cathepsin K* dengan CFA-IFA intraperitoneal dapat meningkatkan titer IgG anti-*cathepsin K* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang diovariectomi, tetapi tidak berpengaruh secara bermakna terhadap jumlah osteosit dan kadar ALP serum.

SARAN

Perlunya dilakukan eksplorasi dosis dan penelitian lebih lanjut terkait formulasi vaksin yang diperlukan untuk menginduksi efek osteoprotektif yang adekuat. Selain itu diperlukan juga penelitian lain untuk mengetahui efek vaksin dalam menurunkan degradasi tulang dengan mengukur parameter yang lebih akurat serta efek samping yang ditimbulkan pada berbagai organ lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada Universitas Brawijaya dan pihak-pihak terkait yang telah memfasilitasi dan membantu berjalannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mayo JL. A Natural Approach to Menopause. *Applied Nutritional Science Reports* 1999;5(7):1-8.
2. American College of Rheumatology. Osteoporosis. *Atlanta: Arthritis Care and Research* 2010;124-133.
3. World Health Organization (WHO). *Prevention and Management of Osteoporosis*. Geneva : World Health Organization; 2003.
4. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288(3):321-33.
5. Le Gall C, Bonnelye E, Clézardin P. Cathepsin K inhibitors as treatment of bone metastasis. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care* 2008;2(3):218-222.
6. Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G, Gowen M. Cathepsin K, but Not Cathepsins B, L, or S, is Abundantly Expressed in Human Osteoclasts. *The Journal of Biological Chemistry* 1999;May 24;271(21):12511-12516.
7. Christina S. *Efek Ekstrak Kacang Tunggak (Vigna unguiculata) terhadap Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Serum Tikus Putih (Rattus norvegicus) Strain Wistar yang telah Diovariectomi*. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya; 2010.

8. Lecaille F, Kaleta J, and Broemme D. Human and Parasitic PapainLike Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design. *Chem. Rev.* 2002;102:4459–4488.
9. Arieska AW. *Efek Ekstrak Etanol Daun Ceplukan (Physalis minima L.) terhadap Jumlah Sel Osteoklas Tikus Wistar (Rattus norvegicus) Pasca Ovariectomy*. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya; 2010.
10. Fachrul DOH. *Efek Ekstrak Etanol Daun Ceplukan (Physalis minima L.) terhadap Jumlah Sel Osteoblas Tikus Wistar (Rattus norvegicus) Pasca Ovariectomy*. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya; 2010.
11. Dahlan SM. *Seri Statistik: Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan; Uji Hipotesis dengan Menggunakan SPSS Program 12 Jam*. Jakarta: Arkans. Hal. 4-26; 2004.p.90-101.
12. Abbas AK and Andrew HL. *Basic Immunology: Function and Disorder of The Immune System* 2nd Edition. Philadelphia: Elsevier Inc.;2004.p.87-89.
13. Troen, Bruce R. Molecular Mechanisms Underlying Osteoclast Formation and Activation. *Experimental Gerontology* 2003;38:605–614.
14. Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG. *Cathepsin K, Enzyme Immunoassay for The Quantitative Determination of Cathepsin K in Serum or Cell Culture Supernatants*. Divischgasse: Biomedica Gruppe.;2001.
15. Hou, WS, *et al.* Comparison of Cathepsins K and S Expression Within the Rheumatoid and Osteoarthritic Synovium. *American College of Rheumatology*2002;46(3): 663-674.
16. Tepel C, Broemme D, Herzog V, and Brix K. Cathepsin K in thyroid epithelial cells: Sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *J. Cell Sci.*2000;113:4487–4498.
17. Bu'hling F, Rocken C, BraschF, Hartig R, Yasuda Y, Saftig P, Broemme D, and Welte T. Pivotal role of cathepsin K in lung fibrosis. *Am. J. Pathol.*2004;164:2203–2216.
18. Godat E, Lecaille F, Desmazes C, Duchene S, Weidauer E, Saftig P, Broemme D, Vandier C, and Lalmanach G. Cathepsin K: A cysteine protease with unique kinin-degrading properties. *Biochem. J.*2004;383:501–506.
19. Chapman Jr HA and Shi GP. Protease injury in the development of COPD: Thomas A. Neff Lecture. *Chest*2000;117: 295S–299S.
20. Chapman HA, Riese RJ, and Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.*1997;59:63–88.
21. Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M., Drake FH, McQueney MS, Foged NT, Delmas PD, and Delaisse JM. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J. Biol. Chem.*1998;273:32347–32352.
22. Kafienah W, Broemme D, Buttle DJ, Croucher LJ, and Hollander AP. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem. J.*1998;331: 727–732.
23. Yasuda Y, Li Z, Greenbaum D, Bogoy M., Weber E, and Broemme D. Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. *J. Biol. Chem.*2004;279: 36761–36770.
24. Kamolmatyakul S. IL-1 α Stimulates Cathepsin K Expression in Osteoclasts via the Tyrosine Kinase-NF- κ B Pathway. *Cytokine Biology Forsyth Institute*2004;83(10):791-796.