

EFEK GEN *CARBONIC ANHYDRASE 12* (CA12) PADA STRUKTUR MAKROSKOPIS, MIKROARSITEKTUR, DAN HISTOLOGIS MENCIT JANTAN DENGAN DELESI SPESIFIK GEN CA12

Tazkia Azmi Salima*, Silvy Amalia Falyani*, Rahma Triliana*

*Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Email: tazkiaazmi@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: Carbonic Anhydrase 12 (CA12) gene is responsible for the production of Carbonic Anhydrase XII protein (CAXII). CAXII is a major catalyst for converting carbon dioxide (CO₂) and water (H₂O) into bicarbonate ion (HCO₃⁻) and hydrogen (H⁺) which responsible for various physiological properties. This study aims to analyze the effect of CA12 deletion on bone growth, microarchitecture and histological structure of the calvarial.

Methods: Study was conducted on 16 weeks old male mice divided into 2 groups; *Osteocyte Carbonic Anhydrase 12* floxed mice (ObCar12 HOM-C) and *osteocyte specific knock-out* of CA12 gene (ObCar12 HOM-KO). Macroscopic structures of the calvarias were analyzed using faxitron images and measured using Image J. Calvarial microarchitecture were analyzed using micro-CT Skyscan 1174 and CT-Analyses while histological assessments were conducted on Hematoxylin & Eosin (H&E) and Renee's modification of Toluidine Blue (TOL) staining and imaged using Nanozoomer and NDP analyzer. Results were analyzed using t-test, and p is set at 0.05.

Results: There is no significant effect of specific gene deletion on the growth of calvarias shown by similar calvarial width, length, and depth (0.68 ± 0.01 vs 0.68 ± 0.01) between two groups. Calvarial microarchitecture of ObCar12 also shows no significant differences in BV/TV (5.33 ± 0.47 vs 5.01 ± 0.57), trabecular number, thickness or separation. Histological analyses of the calvarias by measuring occupied lacunae (90.0 ± 0.83 vs 91.7 ± 1.42), empty lacunae, average number of lacunae, and total area of lacunae in both groups also shows no significant differences ($p > 0.05$).

Conclusion: Specific deletion of CA12 gene in osteocytes does not affect calvarias macroscopic, microarchitecture and histological structures.

Keywords: CA12, cre-loxP system, calvarial, number of lacunae, Carbonic Anhydrase, bone remodeling.

PENDAHULUAN

Osteoporosis merupakan kelainan tulang yang ditandai dengan penurunan kekuatan dan perubahan struktur mikroarsitektur tulang yang berakibat pada peningkatan resiko terjadinya fraktur¹. Insiden patah tulang akibat osteoporosis di Asia akan meningkat 50% di tahun 2050.² Kesalahan diagnosis dan penanganan yang kurang maksimal pada pasien dengan resiko tinggi osteoporosis menjadi salah satu penyebab peningkatan insidensi dan resiko disabilitas akibat fraktur.³

Secara klinis, diagnosa osteoporosis ditegakkan dengan menilai densitas tulang atau *Bone Mineral Density* (BMD) yang dipengaruhi oleh keseimbangan aktifitas osteoblas dan osteoklas pada proses *remodeling* tulang.⁴ Ketidakseimbangan aktifitas osteoklas dan osteosit akan menyebabkan keadaan osteoporosis melalui proses resorpsi tulang⁵. Resorpsi tulang dapat terjadi akibat proses *osteoclastic bone resorption* yang diperantarai oleh *receptor activator of nuclear factor κ B ligand* (RANKL) dan *osteocytic osteolysis* yang diperantarai oleh perubahan pH.^{6,7}

Pada proses *osteocytic osteolysis*, penurunan densitas tulang diawali dengan perubahan pH yang mengubah lingkungan mikro osteosit, hal ini menyebabkan kematian osteosit serta membuat *porous* (lubang) dalam tulang⁷. Perubahan pH dapat terjadi akibat aktivasi enzim *Carbonic Anhydrase* (CA) yang merubah H_2CO_3^- menjadi $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$. Kondisi asam akan mempercepat proses resorpsi dan menyebabkan osteolitik pada tulang.⁸

Carbonic Anhydrase merupakan isoenzyme aktif yang memiliki 12 bentuk isoform. Isoform *cytosolic* terdiri atas CAI, CAII, CAIII, CAVII, CAXIII, sedangkan *membrane-bound* terdiri atas CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV, CAXV. Diantara semua isoform enzim CA, kadar isoform CA II dan CAXII diketahui paling banyak ditemukan pada osteosit tulang sehingga diduga berperan pada proses *osteocytic osteolysis*.⁹

Enzim *Carbonic anhydrase* XII dikode oleh gen CA12 yang terdapat pada kromosom 15 lengan pendek q22.2.¹⁰ Enzim ini juga ditemukan pada ginjal, pankreas, kolon dan secara ektopik dapat diproduksi oleh sel kanker.¹¹ CAXII juga berperan pada pembentukan tulang dan embriologi sistem saraf pusat karena berperan pada fungsi *remodeling* tulang. Namun peran CA XII pada tulang dan sel osteosit belum dapat dijelaskan secara pasti karena banyaknya faktor yang berperan pada mekanisme kerja osteosit dan regulasi metabolisme tulang.

Untuk mengetahui peran dari gen CA12 pada mekanisme kerja sel osteosit dan regulasi metabolisme tulang maka dikembangkan mencit dengan delesi spesifik CA12 dengan teknik *Cre_Lox_P*. Delesi gen CA12 pada osteosit mencit

ini diharapkan dapat membuka pengetahuan tentang peran protein CAXII pada pengendalian pH pada proses *osteocytic osteolysis*, terutama perannya pada densitas tulang dan pembentukan *porous* (lubang pada tulang).

Laboratorium *Orthopaedic & Trauma University of Adelaide* telah berhasil mengembangkan mencit dengan delesi spesifik gen CA XII di sel osteosit. Namun, peran delesi gen CA12 di sel osteosit pada struktur histologis dan struktur mikroskopik tulang kalvaria mencit belum diketahui sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui peran gen CA 12 pada struktur tulang kalvaria.

METODE

Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan secara studi eksperimental laboratorium *in vivo* dengan desain penelitian *control group posttest only* menggunakan hewan coba mencit delesi gen *Carbonic Anhydrase* 12 (CA12).

Penelitian ini mendapat surat layak etik tertanggal 31 Mei 2012 dari *The University of Adelaide* dan komite etik penelitian *SA Pathology Animal Ethics* dengan nomor proyek M-2012-092. Penelitian dilakukan dalam dua tahap dimulai pada bulan Mei 2016 hingga bulan Februari tahun 2017.

Penelitian tahap pertama meliputi pemeliharaan, perlakuan hingga eksekusi hewan coba dilakukan di *animal house*, *SA Pathology, Adelaide, South Australia* pada bulan Mei 2016 sampai bulan Januari 2017.

Penelitian tahap kedua meliputi pengambilan sampel. Proses pemeriksaan variabel, dan analisa data penelitian dilaksanakan di Departemen *Orthopaedic & Trauma Adelaide University Medical School, SA Pathology, Adelaide, South Australia* pada tanggal 12 Januari sampai dengan 27 Februari 2017.

Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan mencit dengan strain C57BL/6 J (B6) yang diperoleh dari *Animal House SA Pathology, Adelaide, South Australia*. Mencit yang digunakan adalah mencit *Osteocyte Carbonic Anhydrase 12* (*OyCA12*)^{fl/flcre-} dan mencit *Knock-Out* spesifik gen CA12 atau *KO-OyCA12*^{fl/flcre+}.

Proses Pembuatan Mencit

Untuk mendapatkan mencit *Knock-Out* dilakukan modifikasi genetik menggunakan teknik *Cre_Lox_P* system, yaitu suatu teknik delesi gen yang spesifik pada sel yang spesifik pula. *Cre_Lox_P* system dilakukan dengan mengawinkan mencit homozygous *Lox_P* CA12 dengan mencit

heterozygous Cre⁺. Mencit *homozygous Lox_P CA12* dihasilkan dengan cara menginsersi penanda gen sehingga dapat menandai gen CA12. Mencit heterozygous Cre CA12 didapatkan dengan cara menginsersikan *promoter driven-cre recombinase Dentin matrix protein 1 (DMP 1)*, dan *Osteocalcin (OCN)* pada gen CA12.

Hasil dari perkawinan kedua mencit transgenik tersebut akan menghasilkan mencit kontrol OyCA12^{fl/fl+Cre-} dan mencit *Knock-Out* spesifik OyCA12^{fl/fl+Cre+}. Semua proses ini dilaksanakan di laboratorium tempat pengambilan sampel.

Pemeliharaan Hewan Coba

Mencit dipelihara di kandang individu (*single cage PUF*A) selama 6 bulan 12 minggu. Diberi makan dan minum sesuai dengan standar laboratorium *animal house* di Departemen *Orthopaedic And Trauma Adelaide University Medical School, SA Pathology, Adelaide, South Australia*. Penggantian sekam dilakukan 2 hari sekali.

Perlakuan Hewan Coba

Pada penelitian ini, mencit kontrol dan mencit KO tidak diberikan perlakuan yang berbeda.

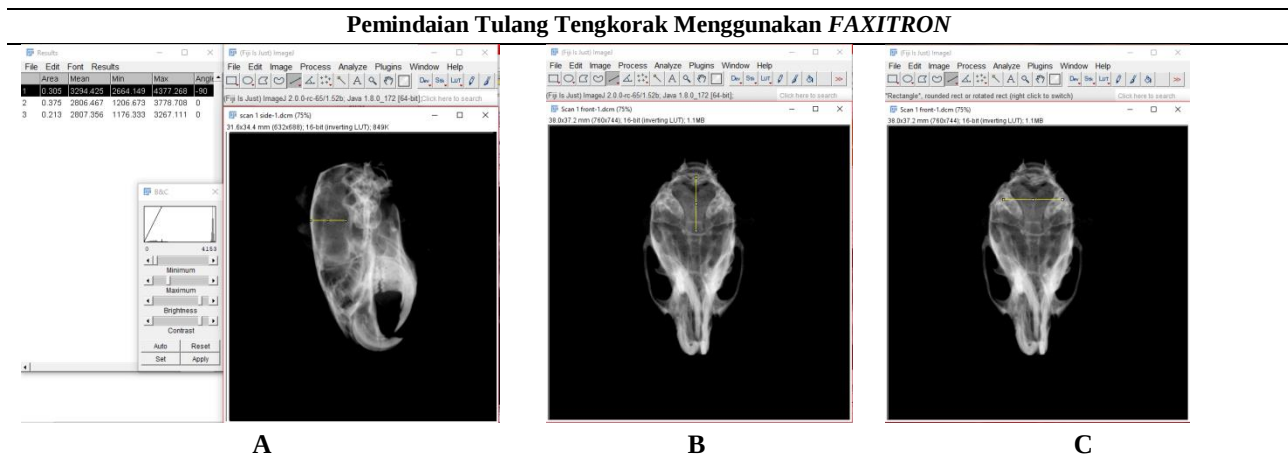
Untuk mendapatkan mencit KO, *breeding* dilakukan sebanyak 6 kali dan dari hasil PCR menunjukkan adanya penurunan ekspresi gen CA12 sebanyak 70%.

Proses Pengambilan Sampel Skull (tulang tengkorak) Mencit

Pengambilan sampel tulang tengkorak diawali dengan anestesi hewan coba menggunakan isoflurane yang kemudian diamati respon taktil dengan mencubit bagian tibia dan regularitas dari detak jantung untuk memastikan mencit teranastesi.

Proses pengambilan sampel *skull* (tulang tengkorak) dimulai dengan dislokasi servikal, dilanjutkan dengan pemotongan menggunakan gunting anatomis pada area servikal. Tulang tengkorak mencit yang sudah dibersihkan dimasukkan ke dalam wadah tertutup yang sudah terisi *Phosphate Buffer Saline (PBS)*.

Sampel tulang tengkorak disimpan dalam wadah tertutup yang berisi cairan PBS, dimasukkan ke dalam kulkas penyimpanan sampel (-20°C) di laboratorium Departemen *Orthopaedic and Trauma* sampai dilakukan pemindaian dengan menggunakan *FAXITRON* dan *Micro-CT*.



Gambar 1 Proses Pemindaian Tulang Tengkorak Mencit ObCar12 menggunakan *FAXITRON* pada Program *ImageJ*

Keterangan: **Gambar 1** menunjukkan hasil pemindaian tulang tengkorak mencit ObCar12 menggunakan *FAXITRON*. Penilaian (A) ketebalan tulang, (B) panjang tulang dan (C) lebar tulang tengkorak dilakukan menggunakan program *ImageJ*

dimasukkan ke dalam alat *FAXITRON* dan dipastikan tanda ON pada tombol pintu dalam keadaan menyala.

Pemeriksaan Struktur Tulang Kalvaria

Pemeriksaan struktur tulang kalvaria dilakukan dengan metode pemindaian menggunakan *FAXITRON* dan *MicroCT*. Pemindaian sampel kalvaria menggunakan *FAXITRON* dimulai dengan pemindahan sampel tulang tengkorak mencit dari wadah penyimpanan ke papan *FAXITRON* (*FAXITRON board*) menggunakan pinset anatomi. Sampel dikeringkan dengan *paper towel* dan dipastikan orientasinya benar. Papan sampel

Pengaturan waktu dan tegangan listrik dilakukan sebelum tombol ON (tombol warna hijau) ditekan. Setelah pemindaian selesai, dilakukan evaluasi hasil pemindaian di komputer. Apabila gambar pemindaian sudah benar, maka dilakukan penyimpanan gambar dengan format .dem di folder yang telah disediakan.

Pengukuran tulang tengkorak dilakukan menggunakan program *ImageJ*. Pada penelitian ini dilakukan tiga pengukuran yaitu *skull length* (panjang kalvaria) *skull width* (lebar kalvaria) *skull depth* (tebal kalvaria) seperti pada **gambar 1**.

Pemindaian menggunakan Mesin Micro-CT

Sebelum melakukan pemindaian, sampel tulang tengkorak dimasukkan ke dalam mesin *Micro-CT* merk *SkyScanner* tipe 1174 dengan posisi tegak lurus, dilanjutkan dengan membuka aplikasi *SkyScanner* di komputer. Pada kolom menu, dilakukan pengaturan aplikasi program dengan pengaturan sebagai berikut: *Source voltage* (kV) 50, *Source Current* (uA) 800, *Small camera pixel* (µm) 20.43, *Large camera pixel* (µm) 40.68, *Image format* TIFF, *Exposure* (ms) 2600, *Rotation step* (deg) 0.80, *Frame averaging* ON (2), *Sharpening* (%) 40, *360 degree scanning* OFF, *Random movement* ON, *Geometrical Correction* ON, *Update flat-field before scanning* OFF, *Partial Width* 100%, *Filter* 0.5mmAl, dengan durasi pemindaian selama kurang lebih 1 jam 20 menit.

Apabila pengaturan program sudah sesuai dengan penjabaran diatas, maka dibuat folder baru di komputer untuk menyimpan hasil pemindaian pada Data C dengan penjabaran sebagai berikut C:\Results\MattP\Skulls\ObCar12_(sampel)_(kosong kan), dilanjutkan dengan menekan tombol “scan” pada layar komputer untuk memulai proses pemindaian.

Pengukuran data ketebalan trabekula, kortikal dan volume tulang tengkorak dari proses pemindaian *Micro-CT* menggunakan program *nRecon & CtAn*. Program *nRecon* digunakan untuk rekonstruksi posisi tulang tengkorak agar sejajar pada semua sampel. Setelah dilakukan proses rekonstruksi, dipilih *region of interest* (ROI) dari sampel tulang tengkorak. Pada penelitian ini, ROI yang dipilih adalah bagian kalvaria, kemudian dilanjutkan dengan analisa data menggunakan program *CtAn*.

Prosedur Pembedahan Tulang Tengkorak

Sampel tulang tengkorak yang telah dipindai kemudian dilakukan pembedahan dengan cara pengguntingan di dekat kepala, kemudian dibuat dua potongan sirkuler dan diangkat bagian *calvarium* dengan cara mengikis otaknya. *Calvarium* direndam dalam cairan dekalsifikasi “*osteosoft*” dan diletakkan pada *shaker* selama 24 – 48 jam. Setelah 1 – 2 hari, bagian kalvaria yang dibutuhkan dipotong dan diletakkan di kaset histologi.

Pemeriksaan Struktur Histologi Tulang Kalvaria

Tulang kalvaria yang telah difiksasi dengan formalin kemudian dilakukan proses *parafin*

embedding. Sebelum dilapisi dengan parafin, jaringan histologi akan melalui proses dehidrasi menggunakan alkohol untuk menghilangkan kandungan air dalam jaringan. Setelah dilakukan dehidrasi, jaringan akan dibersihkan menggunakan *Histoclear* (pengganti xylol yang bersifat lebih aman) atau *cedar oil*. Jaringan histologi kemudian dilapisi oleh parafin dan dikeringkan. Setelah kering, jaringan dipotong menggunakan *microtome* dengan ketebalan 6-8 mikron.

Pada penelitian ini, terdapat dua macam pewarnaan preparat yaitu *Toluidine Blue* (TOL) dan *Hematoxylin & Eosin* (H&E) modifikasi Renee. Dimana pada pewarnaan preparat TOL modifikasi Renee, cairan toluidine blue diteteskan selama lima detik kemudian ditiriskan dan cairan yang tertinggal dibersihkan dengan tisu. Preparat yang sudah diwarnai dilakukan *mounting* menggunakan DePex Permout yang berbasis Xylene.

Preparat histologi yang sudah siap dianalisa dimasukkan ke dalam rak khusus *NanoZoomer*. menggunakan mode *semi-automatic mode*. Data total luas area lakuna, rerata area lakuna, dan *occupied lacunae* yang didapatkan diukur menggunakan program *Fiji*.

Teknik Analisa Data

Analisa data dilakukan menggunakan *Unpaired T-Test* untuk membandingkan dua populasi dan mengetahui efek dari sebuah perlakuan (dalam hal ini adalah delesi dari gen CA12). Data dinyatakan signifikan apabila p value <0.05. Data diolah secara statistik menggunakan *Graph Pad PRISM 7*.

HASIL DAN ANALISA DATA

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian adalah mencit transgenik dengan usia 36 minggu yang dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol atau ObCar12 HOM C dan kelompok *knock-out* atau ObCar12 HOM KO. Data mengenai karakteristik sampel penelitian dapat dilihat pada **tabel 1** dibawah ini:

Tabel 1 Karakteristik Sampel

Komponen	Kelompok	
	ObCar12 HOM C	ObCar12 HOM KO
Umur	36 minggu	36 minggu
Jumlah mencit per kelompok	10	10
Karakteristik Gen	OyCA12 ^{fl/fl} +Cre-	OyCA12 ^{fl/fl} +Cre+

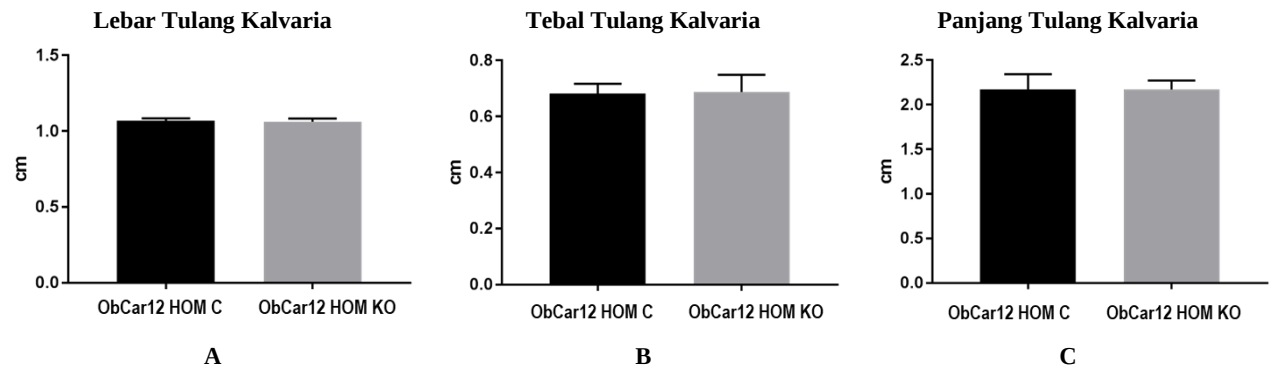
Ekspresi gen CA12	100%	30%
--------------------------	------	-----

KO yaitu OyCA12^{fl/fl+Cre+} telah diberikan *recombinase* DMP-1 dan OCN sehingga ekspresi gen CA12 menurun hingga 70%.

Keterangan: Tabel 1 menunjukkan karakteristik sampel kelompok kontrol dan KO. Kelompok kontrol menggunakan mencit *flox* yaitu OyCA12^{fl/fl+Cre-} telah diberi penanda *lox_P* namun belum ada delesi gen CA12 sedangkan pada kelompok

Jumlah mencit per kelompok dihitung melalui rumus Federer sehingga menghasilkan jumlah 10 mencit per kelompok. Pada kelompok kontrol digunakan mencit *flox* yaitu ObCar12 HOM C dimana belum ada delesi dari gen CA12 namun telah

diberi penanda *Lox_P* sedangkan pada kelompok KO ObCar12 HOM KO yaitu telah diberikan *recombinase* yaitu DMP-1 dan OCN sehingga ekspresi gen CA12 telah berkurang hingga 70% akibat proses pemotongan dari *recombinase*.

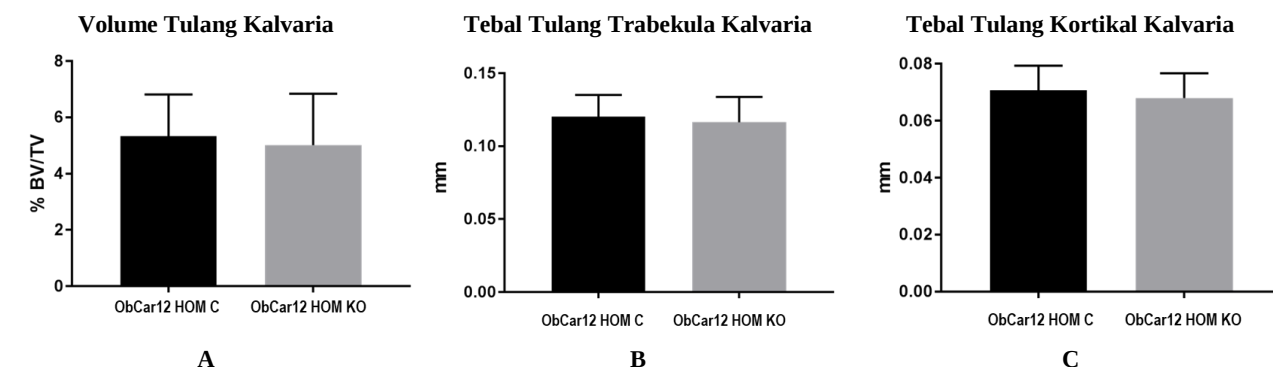


Gambar 2 Hasil Pengukuran Struktur Makroskopis Tulang Kalvaria

Keterangan: Gambar 2 menunjukkan hasil pertumbuhan tulang kalvaria dilihat dari (A) lebar tulang kranial (B) ketebalan tulang kranial dan (C) panjang tulang kranial. Tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara kelompok kontrol (ObCar12 Hom C) dan kelompok perlakuan (ObCar12 Hom KO).

Hasil evaluasi struktur makroskopis tulang meliputi pengukuran lebar, tebal dan panjang tulang calvaria yang dapat dilihat pada **gambar 2**. Evaluasi makroskopis dilakukan untuk melihat efek dari delesi Gen CA12 pada proses pertumbuhan dari tulang kalvaria. Pada pemeriksaan makroskopis, tidak didapatkan perbedaan struktur makroskopis tulang calvaria pada kelompok kontrol dan kelompok KO ($p > 0.05$).

Untuk mengetahui apakah Gen CA12 memiliki pengaruh pada perkembangan mikroarsitektur tulang kalvaria, maka dilakukan evaluasi pada mikroarsitektur tulang. Evaluasi ini dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan pada *porous* (lubang) pada tulang calvaria yang merupakan indikasi terjadinya osteoporosis. Evaluasi mikroarsitektur tulang dapat dilihat pada **gambar 3**.

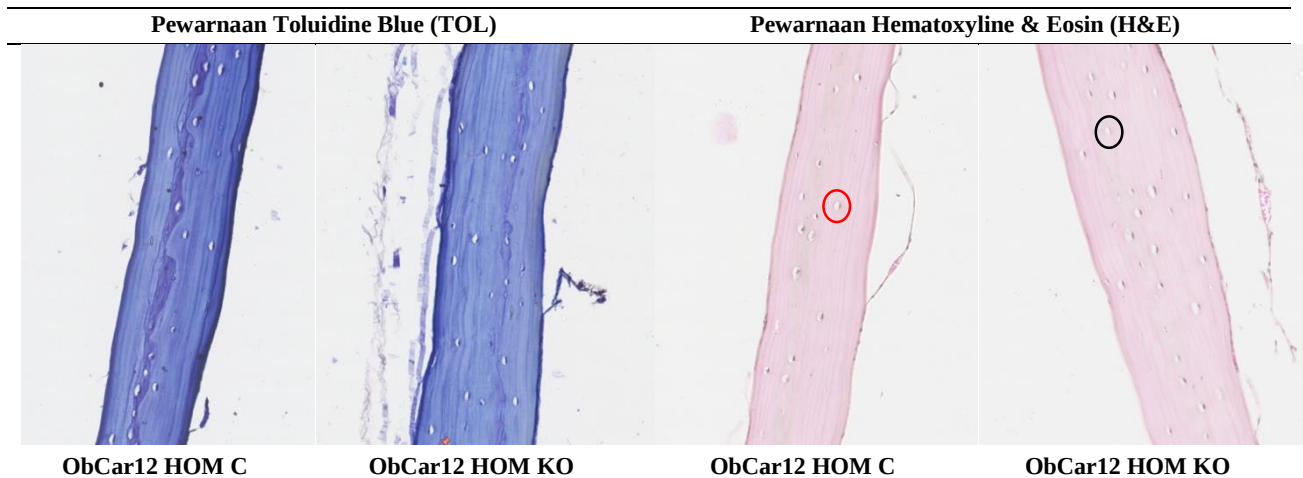


Gambar 3 Hasil Mikroarsitektur Tulang Kalvaria

Keterangan: Gambar 3 menunjukkan hasil mikroarsitektur tulang kalvaria dilihat dari (A) volume tulang kalvaria (B) tebal trabekula tulang kalvaria dan (C) tebal kortikal kalvaria. Tidak didapatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara kelompok kontrol (ObCar12 Hom C) dan kelompok perlakuan (ObCar12 Hom KO).

Hasil evaluasi makroskopis dan mikroarsitektur tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dari kelompok kontrol dan kelompok *knock-out*. Oleh karena itu perlu dilakukan pemeriksaan secara histologis untuk melihat apakah

Gen CA12 memiliki pengaruh pada proses apoptosis maupun differensiasi dari osteosit yang dapat dievaluasi melalui pemeriksaan histologis pada **gambar 4**.

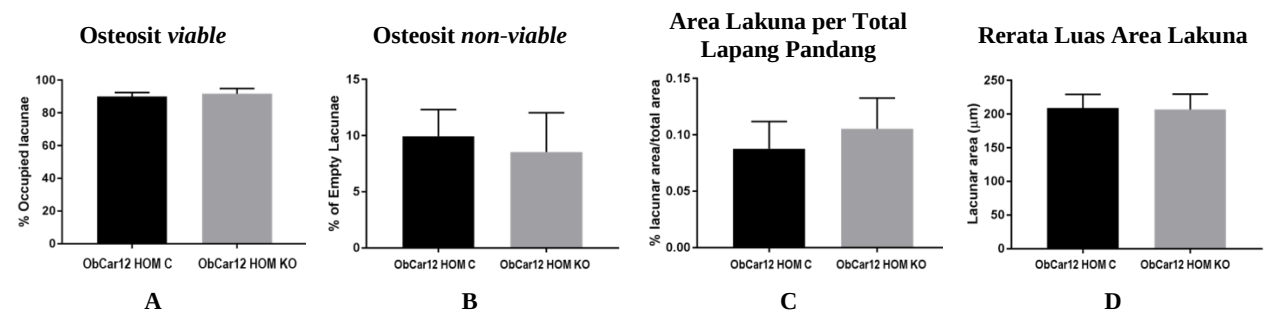


Gambar 4 Gambaran Histologis Tulang Kalvaria dengan Perbesaran 40x

Keterangan: **Gambar 4** menunjukkan gambaran histologis tulang kalvaria pada perbesaran 40x. Pewarnaan Toluidine Blue (TOL) dengan modifikasi Renee dilakukan untuk menghitung rerata lakuna dan total area lakuna. Pewarnaan Hematoxylin Eosin (H&E) dilakukan untuk menentukan viabilitas osteosit dengan menghitung jumlah lakuna yang terisi osteosit (*viable*) ditunjukkan dengan lingkaran warna merah dan lakuna yang tidak terisi osteosit (mati) ditunjukkan dengan lingkaran warna hitam. Pada gambaran diatas terlihat adanya perbedaan pada pewarnaan TOL, dimana luas lakuna pada kelompok KO terlihat kecil dan lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol.

Pada pewarnaan H&E terlihat adanya perbedaan jumlah lakuna dimana HOM KO terkesan memiliki lebih banyak jumlah lakuna yang terisi dan kosong dibandingkan kelompok kontrol. Pada gambaran ini terlihat adanya

perbedaan yang signifikan antar keduanya, namun apabila dievaluasi secara statistik perbedaan antar kelompok tersebut tidak signifikan, hal ini dapat dilihat pada **gambar 5**.



Gambar 5 Hasil Histologis Tulang Kalvaria

Keterangan: **Gambar 5** menunjukkan hasil struktur histologis tulang kalvaria dilihat dari (A) jumlah osteosit yang hidup (B) jumlah osteosit yang mati (C) luas area lakuna per total lapang pandang dan (D) luas rerata lakuna kalvaria. Tidak didapatkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara kelompok kontrol (ObCar12 Hom C) dan kelompok perlakuan (ObCar12 Hom KO).

PEMBAHASAN

Peran Karakteristik Populasi pada Hasil Penelitian

Pada penelitian ini, hewan coba yang digunakan adalah mencit dengan strain C57BL/6 J (B6) yang

umum digunakan untuk penelitian kardiovaskular, transgenik atau mutasi genetik secara langsung maupun terstruktur. Pemilihan hewan coba mencit didasari oleh persamaan struktur genetik secara keseluruhan sebanyak 85% identik dengan manusia, dimana beberapa gen tertentu memiliki 99% kemiripan genetik,

dan beberapa gen lain memiliki kemiripan sebanyak 60%.¹¹

Pemilihan hewan mencit pada penelitian ini juga didasari oleh kemiripan sistem regulasi molekular terutama pada proses penuaan. Selain itu, hewan coba mencit relatif lebih murah mudah perawatannya apabila dibandingkan dengan hewan mamalia lain. Oleh sebab itu, mencit tipe ini merupakan hewan coba yang ideal untuk mempelajari penyakit genetik serta penyakit multifaktorial lain yaitu kanker, penyakit kardiovaskular, diabetes, dan arthritis.¹¹

Pada penelitian ini umur mencit yang digunakan adalah 36 minggu. Apabila di konversikan pada umur manusia menggunakan rumus 1 tahun manusia sama dengan 9 hari untuk mencit, maka sampel mencit yang digunakan berumur setara dengan 28 tahun umur manusia.¹¹ Menurut teori, morfologi muskuloskeletal pada manusia berhenti secara maksimal pada umur 14-25 tahun, kemudian dilakukan proses remodeling seumur hidup. Oleh karena itu, umur mencit pada penelitian ini dapat merepresentasikan kondisi tulang yang telah matur secara sempurna.¹²

Jumlah sampel yang digunakan dirumuskan dengan rumus Federer. Apabila merujuk pada tabel 1 halaman 3 perbedaan dari kedua populasi adalah ekspresi dari gen CA12 yang menurun sebanyak 70% yang dinilai melalui *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan kriteria *Knock Out Mouse Phenotyping Projects* (KOMP2) pada kelompok ObCar12 HOM KO.

Pengaruh Gen CA12 terhadap Struktur Tulang Kranial

Struktur makroskopis tulang pipih dipengaruhi oleh beberapa faktor contohnya, proses embriologis, struktur genetik, asupan makronutrien dan mikronutrien, hingga kadar hormon dalam tubuh.¹³

Pada penelitian yang dilakukan oleh Marie (2010) menyatakan bahwa pada proses remodeling tulang diperlukan asupan mikronutrien yang cukup, terutama kalsium. Hal ini dikarenakan kalsium bekerja dengan cara mengatur regulasi rekrutmen, differensiasi, dan viabilitas dari osteoblas.¹⁴

Hasil yang didapat dari penelitian ini, tidak menunjukkan adanya perbedaan struktur makroskopik tulang kalvaria yang signifikan antara kelompok ObCar12 HOM C dan ObCar12 Hom KO. Secara fisiologis, proses pertumbuhan dan *remodeling* tulang kalvaria pasca kelahiran dipengaruhi oleh tiga faktor utama yaitu pertumbuhan sutura, proses *remodeling* dan pergerakan dari tulang.¹⁵

Peningkatan pada lebar tulang kranial dapat disebabkan oleh proses osifikasi dari jaringan ikat di sutura interparietal, lambdoidal, parietospherinoidal dan parietotemporal. Pada penelitian ini, tidak didapatkan adanya defek pada salah satu sutura, hal ini menunjukkan bahwa proses osifikasi tulang kranial

tidak dipengaruhi oleh delesi gen CA12 atau masih bisa dikompensasi oleh gen atau protein lain.¹⁶

Peningkatan panjang tulang kranial dapat disebabkan oleh pertumbuhan dari basis kranial dengan respon aktif di bagian sutura koronaria. Pada penelitian ini tidak didapatkan pemanjangan tulang kalvaria pada kelompok ObCar12 HOM KO. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat inaktivasi respon sutura koronaria atau adanya penurunan proses pertumbuhan dari basis kranial yang diduga disebabkan oleh delesi gen CA12 secara langsung maupun tidak langsung.¹⁵

Peningkatan ketebalan tulang kranial dapat disebabkan oleh aktifitas dari sutura parietal, occipital, temporal serta sphenoid. Pada penelitian ini tidak didapatkan adanya penebalan tulang kranial pada kelompok ObCar12 HOM KO, hal ini menunjukkan bahwa aktifitas sutura parietal, occipital, temporal, serta sphenoid tidak dipengaruhi oleh delesi gen CA12 atau masih ada proses kompensasi pada daerah sutura tersebut.¹⁷

Selain faktor genetik, immobilitas dari tulang kalvaria diduga menjadi penyebab dari hasil penelitian yang tidak signifikan. Hal ini diduga disebabkan karena pada tulang pipih tidak dipengaruhi oleh mobilitas maupun perubahan hormon tubuh seperti halnya pada tulang panjang.⁷

Pengaruh Gen CA12 pada Mikroarsitektur Tulang Kalvaria

Mikroarsitektur tulang merupakan standar pengukuran kualitas tulang pada manusia. Kekuatan tulang dipengaruhi oleh distribusi spasial dari massa tulang, mikroarsitektur kortikal dan trabekular tulang, serta faktor intrinsik dari setiap komponen tulang. Kejadian fraktur diakibatkan oleh kekuatan eksternal berupa benturan yang melebihi kekuatan tulang.¹⁸

Penelitian yang dilakukan oleh Chang et al. pada tahun 2010 melaporkan bahwa efek variasi genetik *Secreted Phosphoprotein 1* (SPP-1) atau yang biasa disebut Osteopontin (OPN) dapat memprediksi resiko osteoporosis pada pasien. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa mikroarsitektur tulang dapat dipengaruhi oleh ekspresi genetik yang bersifat osteogenik.¹⁹

Pada penelitian ini, mikroarsitektur tulang kalvaria diukur menggunakan *Micro-CT* kemudian di reposisi ulang menggunakan program *NRecon*. Pada penelitian ini, hasil yang didapatkan menunjukkan tidak ada perubahan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok delesi gen CA12.

Hasil yang tidak signifikan tersebut diduga disebabkan oleh lapisan kortikal tulang kalvaria yang terlalu tipis, atau lapisan kulit yang terlalu tebal sehingga pengukuran yang dilakukan kurang akurat dibandingkan pada tulang lain.¹² Jenis tulang yang memiliki bagian kortikal yang cukup tebal untuk

dilakukan penilaian antara lain adalah tibia dan femur.¹⁵

Hal ini dibuktikan dengan hasil penelitian lain mengenai delesi CA12 di tulang tibia yang menunjukkan adanya perubahan mikrostruktural yang signifikan pada ObCar12 HOM KO. Pada tulang tibia ditemukan penurunan ketebalan trabekula yang signifikan pada kelompok ObCar12 HOM KO dibandingkan ObCar12 HOM C. Hal ini diduga akibat proses *remodeling* tulang panjang lebih dinamis dan berlangsung seumur hidup, sehingga proses perubahan tulang tersebut sangat dipengaruhi oleh ekspresi gen dan protein yang bersangkutan.¹⁵

Apabila gen CA12 berpengaruh pada perkembangan tulang kalvaria, maka hasil mikroarsitektur tulang kalvaria akan menunjukkan adanya perbedaan tebal rongga trabekular dimana ObCar12 HOM KO akan lebih berlubang dibandingkan ObCar12 HOM C.

Selain faktor genetik, perkembangan tulang juga dipengaruhi oleh asupan mikronutrien yang cukup, terutama kalsium dan fosfat. Pada penelitian ini, tikus diberikan pakan standar dengan jumlah kalsium dan fosfor yang cukup, sehingga tidak diperlukan aktifitas gen CA12 yang masif dalam proses remodeling tulang.²⁰

Pengaruh Gen CA12 pada Struktur Histologis Tulang Kalvaria

Empty lacunae (lakuna yang terisi osteosit) merupakan metode paling sederhana untuk indikasi proses apoptosis osteosit. Pada penelitian ini tidak didapatkan penurunan jumlah *empty lacunae* yang signifikan pada kelompok ObCar12 HOM KO.¹⁷

Luas rerata serta alterasi struktur pada lakuna ditentukan oleh sinyal mekanis yang diterima oleh osteosit. Adanya peningkatan luas area lakuna menunjukkan adanya tekanan mekanis yang berlebih.¹⁶ Selain itu, viabilitas dari sel osteosit dan luas lakuna ditentukan oleh berbagai protein, diantaranya hormon paratiroid, *carbonic anhydrase 2* (CA2), *matrix metalloproteinase 13* (MMP-13) sehingga apabila tidak ada kerusakan pada jalur tersebut, tulang kalvaria masih dapat melakukan kompensasi dari delesi gen CA12.⁷

Penjelasan dari hasil penelitian ini adalah dugaan adanya proses kompensasi dari protein lain seperti Sclerostin yang menghambat pembentukan osteoblas baru sehingga osteosit yang rusak tidak dapat diganti dengan osteosit yang baru.⁹

Pada setiap lakuna dalam tulang diisi oleh satu osteosit. Fungsi lakuna adalah sebagai mekanoreseptor dari perubahan pH maupun mikro-fraktur dari tulang. Osteosit akan mengirimkan *feedback* dari sinyal yang diberikan oleh lakuna. Kompensasi yang dilakukan oleh osteosit pada perubahan *micro-environment* tulang

dapat dilakukan dengan cara merubah struktur lakuna maupun kondisi pH dari lakuna. Oleh karena itu, perubahan pada struktur lakuna dapat menjadi indikasi dari aktifitas osteosit.⁶

Perubahan struktur lakuna akan mempengaruhi fungsi dari lakuna tersebut. Salah satu fungsi utama dari lakuna adalah mendeteksi adanya perubahan pH maupun mikro-fraktur dari tulang. Informasi tersebut akan disampaikan pada osteosit untuk dilakukan proses remodeling tulang, sehingga penurunan atau perubahan dari struktur lakuna akan mengubah struktur makroskopis dari tulang.⁶

Proses diferensiasi sel osteosit ditentukan oleh beberapa faktor, salah satunya gen *Carbonic Anhydrase* yang memiliki berbagai isoform, diantaranya CA12, CA 2 dan CA3. Gen tersebut akan menghasilkan enzim *Carbonic Anhydrase* untuk proses mempercepat proses *bone remodeling*.^{6,21,22}

Proses *remodeling* pada tulang kalvaria merupakan proses *remodeling* tulang intramembranosa yang didominasi oleh perubahan mekanoreseptor dan perubahan pH. Enzim *Carbonic Anhydrase* dan gen yang berperan pada perubahan pH adalah CA2, CA12 dan CA3, yang paling banyak di ekspresikan di tulang.^{6,23}

Penelitian terbaru menyebutkan bahwa pada tulang kalvaria terdapat peningkatan ekspresi Sclerostin (Sost) dan protein CAIII di osteoblas. CAIII diduga melindungi osteosit dari proses oksidatif sehingga viabilitasnya terjaga.¹⁵ Hal ini mungkin dapat menjelaskan mengapa delesi gen CA12 pada tulang kalvaria tidak memiliki efek yang signifikan pada variabel penelitian akibat over ekspresi dari enzim CAIII.

Sclerostin merupakan protein yang produksi oleh gen SOST di osteosit. Ekspresi gen SOST dipengaruhi oleh *parathyroid hormone* (PTH). Sclerostin memiliki penurunan di PTH dan berperan dalam proses maturasi osteosit.^{9,24} Selain itu, pada penelitian yang sama juga disebutkan bahwa mencit dengan delesi CAIII tidak mengalami perubahan pada pertumbuhan, perkembangan dan usia hidup dari osteosit sehingga diduga bahwa gen CA tidak berperan utama pada proses diferensiasi osteosit karena masih banyak protein lain yang dapat menggantikan peran *remodeling* tulang.^{9,25}

KESIMPULAN & SARAN

Berdasarkan hasil analisis data dan pembahasan yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa gen CA12 tidak berpengaruh pada perkembangan tulang kalvaria pada evaluasi makroskopik, mikroarsitektur maupun secara struktur histologisnya.

Untuk mengembangkan ilmu dan pengetahuan lanjutan tentang efek gen CA12 pada pertumbuhan kalvaria maupun tulang lain, peneliti menyarankan untuk:

1. Melakukan penelitian mengenai gen CA12 pada mencit betina untuk memastikan pengaruh gen CA12 pada jenis kelamin yang berbeda.
2. Melakukan penelitian lanjutan mengenai gen CA12 pada tikus betina dengan *ovariectomy* untuk mengetahui pengaruh hormon estrogen dan progesteron pada aktifitas gen CA12.
3. Melakukan penelitian lanjutan dengan modifikasi diet kalsium maupun mikronutrien lain pada mencit dengan delesi spesifik gen CA12 untuk mengetahui pengaruh diet pada perkembangan tulang kalvaria.
4. Melakukan penelitian lanjutan mengenai pertumbuhan tulang kalvaria pada mencit delesi gen CA12 dengan mengubah kadar hormon paratiroid (PTH) melalui injeksi hormon PTH untuk mengetahui pengaruh hormon PTH pada regulasi gen CA12.
5. Melakukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh aktifitas fisik dan stress fisik pada mencit dengan delesi spesifik gen CA12 untuk mengetahui efeknya pada gen CA12
6. Melakukan penelitian lanjutan mengenai pertumbuhan tulang pipih lain seperti sternum, iga, maupun skapula. pada mencit dengan delesi spesifik gen CA12

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih dihaturkan pada IOM dan FK UNISMA yang telah mendanai penelitian ini beserta dosen pembimbing serta Pak Rio Risandiyansah, PhD atas kritik dan saran yang membangun. Ucapan terimakasih juga saya sampaikan kepada *supervisor* saya, Dr. Matthew Prideaux, PhD atas bimbingan dan kepercayaan yang beliau berikan selama saya melaksanakan penelitian. Ucapan terimakasih juga saya haturkan pada staff laboratorium departemen *Endocrine Bone Research* dan departemen *Orthopaedic & Trauma University of Adelaide*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Trošt, Z., Trebše, R., Preželj, J., Komadina, R., Logar, D. and Marc, J. A Microarray Based Identification of Osteoporosis-Related Genes in Primary Culture of Human Osteoblasts. *Bone*. 2010;46(1):72-80.
2. Gullberg B, Johnell O, Kanis JA. World-Wide Projections For Hip Fracture. *Osteoporos Int* 7:407.
3. *International Osteoporosis Foundation The Asian Audit: Epidemiology, Costs And Burden Of Osteoporosis In Asia*: 2009.
4. Thresholds And The Diagnosis Of Osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 30(10):1747-1753.
5. Drake, M., Clarke, B. and Lewiecki, E. The Pathophysiology And Treatment Of Osteoporosis. *Clinical Therapeutics*. 2015; 37(8):1837-1850.
6. Teti, A. and Zallone, A. Do Osteocytes Contribute To Bone Mineral Homeostasis? Osteocytic Osteolysis Revisited. *Bone*. 2009;44(1):11-16.
7. Wysolmerski, J. Osteocytic Osteolysis: Time For A Second Look?. *BoneKey Reports*. 2012;1:229.
8. Barnett, D., Sheng, S., Howe Charn, T., Waheed, A., Sly, W., Lin, C., Liu, E. and Katzenellenbogen, B. Estrogen Receptor Regulation Of Carbonic Anhydrase XII Through A Distal Enhancer In Breast Cancer. *Cancer Research*. 2008;(9):3505-3515.
9. Oksala, N., Levula, M., Peltö-Huikko, M., Kytömäki, L., Soini, J., Salenius, J., Kähönen, M., Karhunen, P., Laaksonen, R., Parkkila, S. and Lehtimäki, T. Carbonic Anhydrases II And XII Are Up-Regulated In Osteoclast-Like Cells In Advanced Human Atherosclerotic Plaques—Tampere Vascular Study. *Annals of Medicine*, 2010;42(5):360-370.
10. Waheed, A. and Sly, W. Carbonic Anhydrase XII Functions In Health And Disease. *Gene*. 2017;623:33-40.
11. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences*. 2016;152:244-248.
12. Marghoub A, Libby J, Babbs C, Pauws E, Fagan M, Moazen M. Predicting calvarial growth in normal and craniostotic mice using a computational approach. *Journal of Anatomy*. 2017;232(3):440-448.
13. Martini, F., Nath, J., Bartholomew, E. and Ober, W. *Fundamentals of Anatomy & Physiology*. 2012. 9th ed. Boston, Mass.: Benjamin Cummings:182-297.
14. Marie, P. The calcium-sensing receptor in bone cells: A potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone*. 2010;46(3):571-576.
15. Jin SW, Sim KB, Kim SD. Development and growth of the normal cranial vault: An embryologic review. *J Korean Neurosurg Soc*. 2016;59(3):192–6
16. Ashique A, Hart L, Thomas C, Clement J, Pivonka P, Carter Y et al. Lacunar-canalicular network in femoral cortical bone is reduced in aged women and is predominantly due to a loss of canalicular porosity. *Bone Reports*. 2017;7:9-16
17. Wu S, Lin Z, Yamaguchi A, Kasugai S. The effects of periosteum removal on the osteocytes in mouse calvaria. *Dental, Oral and Craniofacial Research*. 2015;1(5)

18. Brandi, M. Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology*. 2009;48(suppl 4):iv3-iv8.
19. Chang, I., Chiang, T., Yeh, K., Lee, H. and Cheng, Y. Increased serum osteopontin is a risk factor for osteoporosis in menopausal women. *Osteoporosis International*. 2010;21(8):1401-1409
20. Shuid, A., Mohamad, S., Mohamed, N., Fadzilah, F., Mokhtar, S., Abdullah, S., Othman, F., Suhaimi, F., Muhammad, N. and Soelaiman, I. Effects of calcium supplements on fracture healing in a rat osteoporotic model. *Journal of Orthopaedic Research*. 2010; 28(12):1651-1656
21. Barnett, D., Sheng, S., Howe Charn, T., Waheed, A., Sly, W., Lin, C., Liu, E. and Katzenellenbogen, B. Estrogen Receptor Regulation Of Carbonic Anhydrase XII Through A Distal Enhancer In Breast Cancer. *Cancer Research*. 2008;68(9):3505-3515.
22. Supuran, C. Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications For Inhibitors And Activators. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008; 7(2):168-181.
23. Supuran, C. How Many Carbonic Anhydrase Inhibition Mechanisms Exist?. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2015; 31(3):345-360
24. Eijken, M. *Human Osteoblast Differentiation And Bone Formation: Growth Factors, Hormones And Regulatory Networks*. . 2007. Rotterdam: Erasmus Universiteit Amsterdam.
25. Erickson, C. and Payne, K. Inductive Signals and Progenitor Fates During Osteogenesis. *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2018;(242):909–922.