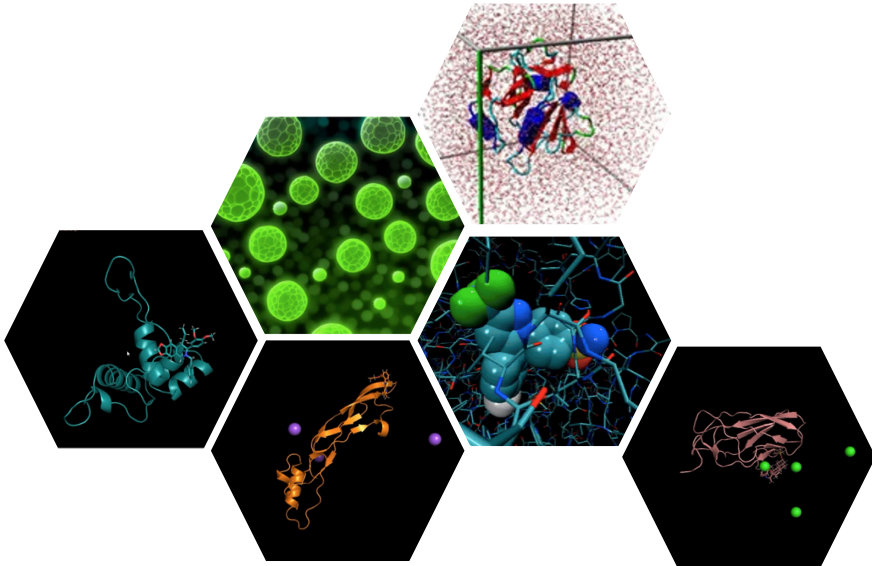


**UJI SIMULASI *MOLECULAR DYNAMIC* DAN SITOTOKSISITAS
EKSTRAK *CHLORELLA VULGARIS* TERHADAP REGENERASI TULANG**

***MOLECULAR DYNAMIC AND CYTOTOXICITY SIMULATION TEST OF
EXTRACT CHLORELLA VULGARIS IN BONE REGENERATION***



**FITRIAN RIKSAVIANTI
J015211006**



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI PROSTODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
2024**

**UJI SIMULASI *MOLECULAR DYNAMIC* DAN SITOTOKSISITAS
EKSTRAK *CHLORELLA VULGARIS* TERHADAP REGENERASI TULANG**

***MOLECULAR DYNAMIC AND CYTOTOXICITY SIMULATION TEST OF
EXTRACT CHLORELLA VULGARIS IN BONE REGENERATION***

**FITRIAN RIKSAVIANTI
J015211006**



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI PROSTODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
2024**

**UJI SIMULASI *MOLECULAR DYNAMIC* DAN SITOTOKSISITAS
EKSTRAK *CHLORELLA VULGARIS* TERHADAP REGENERASI TULANG**

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk
mencapai gelar Profesi Spesialis-1 dalam bidang ilmu prostodonsia

Disusun dan diajukan oleh

**FITRIAN RIKSAVIANTI
J015211006**

Kepada

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI PROSTODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

Uji Simulasi *Molecular Dynamic* dan Sitotoksitas Ekstrak *Chlorella Vulgaris*
Terhadap Regenerasi Tulang

FITRIAN RIKSAVIANTI
J015211006

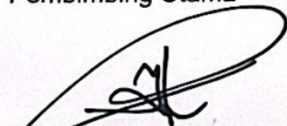
telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Profesi Spesialis-1 pada
tanggal 06 Juni 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS
PROGRAM STUDI PROSTODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR

Mengesahkan:

Pembimbing Utama



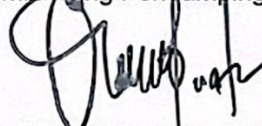
drg. Irfan Dammar, Sp.Pro., Subsp.MFP(K)
NIP. 19770630 200904 1 003

Ketua Program Studi (KPS)
PPD(GS) Prostodontia FKG-UNHAS

drg. Irfan Dammar, Sp.Pro., Subsp.MFP(K)
NIP. 19770630 200904 1 003



Pembimbing Pendamping



drg. Rifaat Nurrahma, Sp.Pro., Subsp.MFP (K)
NIP. 19870825 202208 6 001

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
UNIVERSITAS HASANUDDIN

Irfan Sugianto, drg., M. Med., Ed., PhD
NIP. 19810215 200801 1 009



PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul “Uji Simulasi Molecular Dynamic dan Sitotoksisitas Ekstrak Chlorella Vulgaris Terhadap Regenerasi Tulang” adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing (drg. Irfan Dammar, Sp.Pros(K) sebagai Pembimbing Utama dan drg. Rifaat Nurrahma.,Sp.Pros(K) sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 20 Juni 2024



FITRIAN RIKSAVIANTI
J015211006

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Rabbil 'Alamiin, puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahu Wata'ala atas rahmat dan ridho-Nya, sholawat serta salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad Sallallahu 'Alaihi Wasallam, tiada daya dan kekuatan melainkan dengan izin Allah sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul "Uji Simulasi Molecular Dynamic dan Sitotoksisitas Ekstrak Chlorella Vulgaris Terhadap Regenerasi Tulang"

Penulisan tesis ini bertujuan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Spesialis Prostodonsia-1 di Program Studi Dokter Gigi Spesialis Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin. Tesis ini diharapkan dapat memberikan manfaat bagi pembaca dan peneliti lainnya untuk menambah pengetahuan dalam bidang ilmu kedokteran gigi maupun Masyarakat umum lainnya.

Penyelesaian penelitian dan penyusunan tesis ini penulis menghadapi berbagai hambatan namun berkat bantuan, bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak sehingga akhirnya penulisan tesis ini dapat terselesaikan dengan baik dan tepat waktu. Terima kasih sebesar-besarnya penulis ucapkan kepada:

1. **drg. Irfan Sugianto, M. Med.Ed, Ph. D** sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin beserta seluruh pimpinan fakultas atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Pendidikan Dokter Gigi Spesialis prostodonsia Universitas Hasanuddin Makassar.
2. Pembimbing tesis saya **drg. Irfan Damar, Sp.Pros., Subsp.MFP(K)** dan **drg. Rifaat Nurrahma.,Sp.Pros., Subsp.MFP (K)** atas arahan dan bimbingan dari beliau sehingga penelitian dan penyusunan tesis dapat selesai tepat waktu.
3. Penguji tesis saya **Prof. DR.drg. Bahruddin Thalib, Sp.Pros., Subsp. PKIKG(K), Prof.Dr. Edy Machmud, drg., Sp.Pros., Subsp.OGST(K)** dan **drg. Eri Hendra Jubhari, M. Kes, Sp.Pros., Subsp.PKIKG(K)** atas bimbingan, arahan dan masukannya mengenai penelitian yang sedang saya lakukan sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan dengan baik.
4. Kepada Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah membantu dalam proses penelitian ini.
5. Kepada **Kementerian Kesehatan Republik Indonesia** saya mengucapkan terima kasih atas beasiswa Kemenkes yang diberikan (No. HK. 01. 07/1/13773/2021) selama menempuh program pendidikan dokter gigi spesialis prostodonsia.
6. **drg. Irfan Damar Sp.Pros., Subsp.MFP (K)** Sebagai ketua program study prostodonsia yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran kepada kami semua.
7. **Prof. Moh. Dharmautama, drg., Ph.D., Sp.Pros., Subsp.PKIKG(K), Dr. drg. Ike Damayanti Habar, Sp.Pros., Subsp.PKIKG(K), drg. Muhammad Iqbal, Ph.D., Sp.Pros. Subsp. PKIKG(K), drg. Rahmat, Sp. Pros, drg. Ian Afifah Sudarman Sp. Pros, drg. Mariska Juanita, Sp. Pros** selaku dosen PPDGS Prostodonsia FKG Unhas yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat, arahan dan bimbingan selama studi perkuliahan, dan pengerjaan kasus klinik sehingga karya ilmiah ini dapat terselesaikan dan menjadi lebih baik.
8. Staf akademik dan Staf Tata Usaha FKG Unhas, terkhusus **Kak Bia** dan **Pak Madjid** atas segala bantuan selama penulis menyelesaikan pendidikan.
9. Kepada kedua orang tua tercinta **ayahanda Rohman dan ibunda Hariati**, saya mengucapkan beribu-ribu terima kasih dan sembah sujud atas doa, dukungan finansial, pengorbanan dan motivasi mereka selama saya menempuh pendidikan.

10. Kepada saudariku, **drg. Yunita Indah Sari** terimakasih banyak atas doa, bantuan, masukan dan motivasi selama saya menempuh pendidikan.
11. Teman-teman angkatan saya **drg. Magfirah Ali Polanunu, drg. Hastinawati, drg. Nuriani Anshori, drg. Andi Mirna Nasliah, drg. Faizal fahri, drg. Rizkiani M Ramli, drg. Anisa Nabila Ferri, drg. Fitri Adama.**
12. Kepada senior angkatan 11,12,13 dan 14 terkhusus **drg. Rezki Wahyuni, Sp. Pros, drg. Astri Al Hutami Azis, Sp. Pros** dan **drg. Muthia Mutmainnah Bachtiar, Sp. Pros** atas banyak masukan dan sharing ilmu selama proses penyusunan tesis dan pendidikan.
13. Kepada Tim Percepatan Tesis saya, **drg. St. Rakhmawati. A** yang telah banyak membantu selama proses penyusunan tesis dan selama proses pendidikan.
14. Kepada Chief **drg. Thalib Rifky Samdany** dan rekan2 residen PPDGS Prostodonsia Angkatan **16,17,18,19,20** yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu. terkhusus **drg. Andi Anna Mappewali, drg. Rita Harianti Ladong, drg. Indah Tresnawati, drg. Susi Daniel, drg. Rifaldi Haeruddin** yang telah banyak membantu selama masa studi, saya ucapkan terima kasih dan selamat menempuh pendidikan

Akhir kata, dengan penuh kesadaran dan kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya serta penghargaan kepada semua pihak yang telah berperan dalam penyusunan tesis ini yang tidak sempat penulis sebutkan satu persatu dan semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat, kasih dan karunia-Nya kepada kita semua dan berkenan menjadikan tesis ini bermanfaat.

Makassar, 20 Juni 2024

FITRIAN RIKSAVIANTI

Fitrian Riksavianti. **Uji Simulasi Molecular Dynamic dan Sitotoksitas Ekstrak Chlorella Vulgaris Terhadap Regenerasi Tulang**
(dibimbing oleh Irfan Dammar dan Rifaat Nurrahma)

Latar Belakang : Tingkat osseointegrasi yang dihubungkan dengan marker tulang seperti meliputi osteopontin, osteokalsin, BMP-4, BMP-2, dan RUNX2 mengalami peningkatan pada proliferasi osteoblas di tahap awal osseointegrasi pada permukaan implan. Sebagai alternatif penggunaan bahan sintesis hidroksiapatit yang sering diaplikasikan dalam pengerjaan dental implan, biomaterial *C. vulgaris* yang telah diamati secara in vivo dibuktikan mampu menstimulasi pertumbuhan dan perkembangan fibroblast serta berifat antipreteolitik dan terbukti mempercepat pembentukan jaringan. **Tujuan**: Mengetahui dan menganalisis kestabilan interaksi kompleks senyawa aktif *Chlorella vulgaris* dan lima biomarker osteogenik meliputi osteopontin, osteokalsin, BMP-4, BMP-2, dan RUNX2 melalui uji simulasi molekular dinamik serta prediksi sifat fisikokimia dan prediksi sifat toksisitas senyawa aktif *chlorella* yang memiliki ikatan afinitas tertinggi dengan biomarker osteogenik. **Metode**: Simulasi dinamika molekul menggunakan perangkat lunak Gromacs v.2023.4. Prediksi sifat fisikokimia digunakan pkCSM online tool dan toksisitas senyawa melalui Protox online tool. **Hasil**: Analisis molecular dynamic dilakukan dengan analisis grafik RMSD (Root Mean Square Deviation), analisis grafik RMSF (Root Mean Square Fluctuation) dan analisis grafik RoG (Radius of gyration). Nilai RMSD $\leq 2\text{\AA}$ menunjukkan dinamika molekul cukup stabil saat berikatan antara protein-ligan. Penilaian menggunakan Molecular Mechanics - Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBS) juga dilakukan untuk melihat nilai rata-rata ikatan energi bebas. Dari hasil penelitian semua senyawa berada dalam toksisitas kelas 4 menunjukkan toksisitas yang relatif rendah. **Kesimpulan**: *Chlorella Vulgaris* berpotensi menjadi kandidat senyawa regenerasi tulang dengan resiko toksisitas yang minimal berdasarkan hasil simulasi doking dan molekular dinamikanya.

Kata Kunci : *Chlorella vulgaris*, Osteopontin, Osteokalsin, BMP-4, BMP-2, RUNX2, Molecular Dynamic, Toksisitas.

Fitrian Riksavianti. **Molecular Dynamic and Cytotoxicity Simulation Test of Extract *Chlorella Vulgaris* in Bone Regeneration**
(supervised by Irfan Dammar and Rifaat Nurrahma)

Background: levels of osteointegration associated with bone markers such as osteopontin, osteocalcin, BMP-4, BMP-2, and RUNX2 experienced an increase in osteoblastic proliferation in the early stages of osseointegration on the surface of the implant. As an alternative to the use of hydroxyapatite synthesizers often used in dental implants, *C. vulgaris* biomaterials that have been observed in vivo have been shown to stimulate fibroblast growth and development as well as antiproteolytic mortality and accelerate tissue formation. **Objective:** To know and analyze the stability of the interaction of the complex active compound *Chlorella vulgaris* and five osteogenic biomarker including osteopontin, osteocalcin, BMP-4, BMP-2, and RUNX2 through dynamic molecular simulation tests as well as prediction of the physicochemical properties and predictions of the toxicity properties of the active sensory *Chlorella* that have the highest affinity bond with the osteogenous biomarkers. **Methods:** Simulation of molecular dynamics using software Gromacs v.2023.4. Predicting the physicochemical properties used pkCSM online tool and compound toxicity through Protox online tool. **Results:** Molecular dynamic analysis carried out with RMSD graphics analysis (Root Mean Square Deviation), RMSF graphics and RoG graphical analysis (Radius of gyration). $RMSD \leq 2\text{\AA}$ indicates a relatively stable molecular dynamics when binding between proteins-ligands. Assessment using Molecular Mechanics - Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBS) is also done to see the average value of free energy bonds. From the results of the research, all compounds in class 4 toxicity show relatively low toxicities. **Conclusion:** *Chlorella Vulgaris* is potentially a candidate bone regeneration compound with minimal risk of toxicity based on the results of simulations of its docking and molecular dynamics.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, osteopontin, osteocalcin, BMP-4, BMP-2, RUNX2, Molecular Dynamic, Toxicity.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	<i>i</i>
PERNYATAAN PENGAJUAN.....	<i>iii</i>
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	<i>v</i>
UCAPAN TERIMA KASIH.....	<i>vi</i>
ABSTRAK.....	<i>viii</i>
ABSTRACT.....	<i>ix</i>
DAFTAR ISI.....	<i>x</i>
DAFTAR GAMBAR.....	<i>xii</i>
DAFTAR TABEL	<i>xiii</i>
BAB I PENDAHULUAN.....	<i>1</i>
1.1. Latar Belakang	<i>1</i>
1.2. Teori.....	<i>4</i>
1.2.1 Chlorella vulgaris.....	<i>4</i>
1.2.1.1 Kandungan utama dari <i>chlorella vulgaris</i>	<i>5</i>
1.2.1.2 Kandungan fitokimia <i>C.vulgaris</i>	<i>7</i>
1.2.2 Osseointegrasi.....	<i>9</i>
1.2.3 Remodeling tulang disekitar implan gigi.....	<i>10</i>
2.3.1. Protein biomarker osseointegrasi	<i>14</i>
1.2.4 Uji Simulasi Molecular Dynamic (MD).....	<i>16</i>
1.3. Rumusan Masalah.....	<i>17</i>
1.4. Tujuan Penelitian.....	<i>18</i>
1.3.1. Tujuan Umum	<i>18</i>
1.3.2. Tujuan Khusus.....	<i>19</i>
1.5. Manfaat Penelitian.....	<i>19</i>
1.4.1. Manfaat Untuk Peneliti	<i>19</i>
1.4.2. Manfaat Praktisi.....	<i>19</i>
1.4.3. Manfaat untuk Masyarakat	<i>19</i>
1.4.4. Manfaat ilmu pengetahuan	<i>19</i>
BAB II METODE PENELITIAN.....	<i>20</i>
2.1. Desain Penelitian	<i>20</i>
2.2. Tempat penelitian	<i>20</i>

2.3.	Waktu Penelitian.....	20
2.4.	Sampel Penelitian	20
2.5.	Alat dan Bahan	22
2.6.	Alur Penelitian	22
2.7.	Metode Analisis Data	23
2.8.	Definisi Operasional	24
2.9.	Kerangka Teori	26
2.10.	Kerangka Konsep	27
2.11.	Hipotesis.....	28
BAB III HASIL		29
3.1.	Parameter Simulasi molekular dinamik protein osteogenik dan komponen aktif <i>C. Vulgaris</i>	29
3.1.1.	Dinamika Molekul Osteopontin dan <i>C.Vulgaris</i>	29
3.1.2.	Dinamika Molekul Osteokalsin dan <i>C.Vulgaris</i>	31
3.1.3.	Dinamika Molekul BMP-4 dan <i>C.Vulgaris</i>	33
3.1.4.	Dinamika Molekul BMP-2 dan <i>C.Vulgaris</i>	35
3.1.5.	Dinamika Molekul RUNX-2 dan <i>C.Vulgaris</i>	37
3.2.	Nilai rata-rata parameter RMSD, RMSF dan RoG	39
3.3.	Prediksi sifat fisikokimia dan Toksisitas secara <i>in silico</i>	40
3.3.1.	Lipinski's rule of five (Ro5).....	40
3.3.2.	Prediksi Toksisitas secara <i>in Silico</i>	42
BAB IV PEMBAHASAN.....		44
BAB V PENUTUP		48
7.1.	KESIMPULAN	48
7.2.	SARAN	48
REFERENSI.....		49
LAMPIRAN.....		56

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. 1. Ultrastruktur chlorella vulgaris ¹⁸	4
Gambar 1. 2. Fase reproduksi chlorella vulgaris ³⁹	4
Gambar 1. 3. Osseointegrasi dan biointegrasi ⁴⁵	10
Gambar 3. 1. Grafik RMSD kompleks Osteopontin- (+)-(3S,4S)-N-Benzyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-methylenedioxy-4-2-propenyl)-1,2	29
Gambar 3. 2. Grafik RMSF kompleks Osteopontin- (+)-(3S,4S)-N-Benzyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-methylenedioxy-4-2-propenyl)-1,2	30
Gambar 3. 3. Grafik RoG kompleks Osteopontin- (+)-(3S,4S)-N-Benzyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-methylenedioxy-4-2-propenyl)-1,2	30
Gambar 3. 4. Grafik RMSD kompleks Osteokalsin-Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate	31
Gambar 3. 5. Grafik RMSF kompleks Osteokalsin-Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate	32
Gambar 3. 6. Grafik RoG kompleks Osteokalsin-Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate	32
Gambar 3. 7. Grafik RMSD kompleks BMP-4 - Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate	33
Gambar 3. 8. Grafik RMSF kompleks BMP-4 - Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate	34
Gambar 3. 9. Grafik RoG kompleks BMP-4 - Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate	34
Gambar 3. 10. Grafik RMSD kompleks BMP-2 - pi.-Pentamethylcyclopentadienyl-germanium-(ii)-chlorid.....	35
Gambar 3. 11. Grafik RMSF kompleks BMP-2 - pi.-Pentamethylcyclopentadienyl-germanium-(ii)-chlorid.....	36
Gambar 3. 12. Grafik RoG kompleks BMP-2 - pi.-Pentamethylcyclopentadienyl-germanium-(ii)-chlorid.....	36
Gambar 3. 13. Grafik RMSD kompleks RUNX-2 - 5.alpha.-Pregnan-20-one,3.alpha,17-bis(trimethylsiloxy)-,o-methyl oxime	37
Gambar 3. 14. Grafik RMSF kompleks RUNX-2 - 5.alpha.-Pregnan-20-one,3.alpha,17-bis(trimethylsiloxy)-,o-methyl oxime	37
Gambar 3. 15. Grafik RoG kompleks RUNX-2 - 5.alpha.-Pregnan-20-one,3.alpha,17-bis(trimethylsiloxy)-,o-methyl oxime	38

DAFTAR TABEL

Table 1. Analisis komponen Chlorella kering per 100 gr ¹⁸	9
Table 2. Kompleks ligan-protein yang memiliki nilai afinitas ikatan paling negatif dari hasil simulasi docking	21
Table 3. Nilai rata-rata RMSD, RMSF dan RoG dari Simulasi molekular dinamik untuk kompleks C. Vulgaris dan protein osteogenik.....	39
Table 4. Energi bebas ikatan Simulasi molekular dinamik untuk kompleks C. Vulgaris dan protein osteogenik	39
Table 5. Lipinski's rule of five (Ro5).....	41
Table 6. Prediksi Toksisitas menggunakan Protox II online tool dan pkCSM online Tool	43

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Salah satu permasalahan kesehatan rongga mulut yang banyak dialami masyarakat Indonesia saat ini adalah kehilangan gigi. Berdasarkan laporan RISKESDAS (Riset Kesehatan Nasional) 2018, kehilangan gigi nasional pada usia 35-44 tahun sebesar 1,7% yang semakin meningkat pada usia 65 tahun ke atas 10,1%.¹ Implan gigi merupakan salah satu perawatan kehilangan gigi paling baik hingga saat ini.² Namun untuk penyatuan implan dan tulang (osseointegrasi) seringkali melalui proses yang lama yaitu 3-6 bulan agar dapat mengembalikan fungsi gigi sepenuhnya.^{3,4} Osseointegrasi sebuah konsep yang diperkenalkan oleh Per-Ingvar Branemark.⁵ Proses osseointegrasi cukup kompleks dan ada banyak faktor yang mempengaruhi regenerasi tulang pada permukaan implan.⁶

Keberhasilan osseointegrasi bergantung pada keterkaitan berbagai faktor perancu seperti biokompatibilitas bahan implan, teknik bedah yang digunakan, riwayat kesehatan sistemik selama fase penyembuhan, serta protokol pada saat implantasi.^{7,8} Untuk meningkatkan perlekatan implan dengan tulang sekitarnya, dapat dilakukan penambahan bahan alami yang memiliki sifat biokompatibilitas yang baik dengan toksisitas minimal sebagai biomaterial.⁹ Beberapa literatur mengungkapkan bahwa implan yang dilapisi dengan lapisan osteogenik organik dan anorganik dapat meningkatkan aktivitas permukaan implan dan aktivitas osteopromotive.¹⁰⁻¹² Penelitian Besim dkk mengembangkan metoda pelapisan implan dengan senyawa kalsium fosfat (CaP) terbukti meningkatkan osseointegrasi implan titanium¹³ jika dibandingkan dengan implan titanium murni.¹⁴⁻¹⁶

Di Indonesia salah satu komoditas bahan hayati yang banyak dieksplorasi dan mempunyai potensi tinggi dalam pengembangan obat herbal adalah mikroalga.¹⁷⁻²⁰ Jenis mikroalga yang mewakili mayoritas pasar biomassa mikroalga adalah jenis *spirulina* dan *chlorella*. *Chlorella vulgaris* (*C.vulgaris*) merupakan salah satu jenis mikroalga yang banyak dikembangkan saat ini, dikarenakan spesies ini mudah didapatkan, bersifat ekonomis dan mudah dikultivasi dalam skala industrial dan mampu bertumbuh dalam kondisi autotropik dan mixotropik sehingga mampu mengasimilasi cahaya matahari dan karbon organik sebagai sumber energinya baik secara bersamaan maupun secara bergantian. *C.vulgaris* sebagai spesies mikroalga banyak digunakan dalam bidang bioteknologi, salah satunya dalam bidang kesehatan.²¹⁻²⁴

Komponen aktif pada ekstrak *C.vulgaris* diantaranya protein, chlorellin (anti inflamasi), Chlorella Growth Factor (CGF), ekstrak yang terdiri dari beragam zat termasuk asam amino esensial, peptida, protein, vitamin, gula, dan asam nukleat. Selain itu, terdapat kandungan lain dari *C.vulgaris* diantaranya karotenoid (senyawa antioksidan), klorofil, dan phycobilin (pigmen protein kompleks yang hanya terdapat pada fitoplankton).^{18,25} Kandungan protein *C.vulgaris* kurang lebih

65% dari jumlah kandungan aktif lainnya. CGF yang terletak pada bagian inti sel *C. vulgaris* yang dihasilkan dari fotosintesis dan mampu mereplikasi dengan cepat menjadi empat sel dalam 20 jam sehingga CGF mampu mempercepat perbaikan jaringan pada manusia.²⁵⁻²⁷

Penelitian tentang manfaat ekstrak *C. vulgaris* 5% sebagai bahan bioaktif yang diinjeksikan ke dalam soket sebelum pemasangan implan dapat menstimulasi pertumbuhan dan perkembangan fibroblast serta bersifat antiproteolitik dan terbukti mempercepat pembentukan jaringan,^{22,28,29} namun belum dapat diketahui secara pasti senyawa dari komponen *C. vulgaris* yang dapat berikatan dengan komponen pada jaringan keras dan jaringan lunak. Melalui pendekatan *in silico* pemodelan biomolekular dapat menyelesaikan masalah tersebut secara efisien dan dilakukan oleh multidisiplin ilmu. Pengujian *in silico* juga membantu validasi hasil *in vitro* dan *in vivo*.³⁰

Untuk menghitung nilai LD₅₀ dan menguji iritasi kulit, sebagian besar hewan laboratorium digunakan. Saat ini, masyarakat menunjukkan keprihatinan etis dan penolakan keras terhadap uji toksisitas tradisional. Sejak prinsip 3R – pengurangan, penggantian, dan penyempurnaan – diusulkan oleh B. Russell dan R. Burch,³¹ pendekatan alternatif telah dikembangkan berdasarkan pertimbangan etis kesejahteraan hewan. Secara internasional, pengembangan teknis pengujian *in vitro* menggunakan sel yang dikultur dan analisis komputer *in silico* telah mencapai kemajuan yang memuaskan sehingga pengujian ini dapat dipertimbangkan sebagai alternatif terhadap pengujian *in vivo* yang menggunakan hewan laboratorium.³²

Saat ini penggunaan metode doking mulai diterapkan dalam bidang kedokteran gigi, khususnya dalam menilai efek bahan terhadap regenerasi jaringan. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Ardani dkk yang melihat efek penggunaan kombinasi polieteter keton (PEEK) dan hidroksiapatit (HA) terhadap osseointegrasi mini-implan melalui metode molekular doking. Hasil penelitian menunjukkan afinitas ikatan yang lebih tinggi antara PEEK dan HA terhadap marker osteogenik alkaline phosphat (ALP) dan insulin-like growth factor-1 (IGF-1), sehingga dapat mendukung perawatan pada mini-implan.³³ Almerinda dkk juga melakukan penelitian tentang identifikasi peptida sebagai bahan pelapis implan TiO₂ melalui metode doking, dengan hasil 82 peptida memiliki afinitas ikatan yang tinggi dengan integrin $\alpha\text{S}\beta 1$, $\alpha\text{v}\beta 3$, and $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Penggunaan sel progenitor sebagai target dapat mengurangi waktu penyembuhan dan mencegah infeksi, sehingga membuktikan mempercepat remodeling tulang.³⁴

Pendekatan *in silico* penggunaan biomaterial mikroalga khususnya *C. vulgaris* melalui *molecular docking* telah dilakukan oleh Muthia.³⁵ Hasil simulasi *molecular docking* antara senyawa aktif *Chlorella vulgaris* dengan protein marker osteogenik, termasuk osteopontin, osteokalsin, BMP-4, BMP-2, dan RUNX2, menunjukkan nilai afinitas ikatan yang sangat negatif pada setiap kompleks *docking*.³⁵ Temuan ini menandakan bahwa *Chlorella vulgaris* memiliki potensi

sebagai bahan yang dapat memengaruhi proses remodeling tulang dan osseointegrasi dengan efektif, namun simulasi *molecular dynamic* belum pernah dilakukan sebelumnya.

Dinamika molekuler merupakan suatu simulasi secara virtual yang dapat digunakan untuk melihat interaksi mikroskopik antar molekul. Melalui simulasi dinamika molekuler, akan didapatkan data-data statik dan dinamik antar molekul yang berikatan pada skala atomik, seperti kecepatan, rheologi, maupun gangguan yang bergantung kepada waktu.³⁰ Kelebihan metode *molecular dynamic* diantaranya dapat menekan biaya dan waktu yang diperlukan dalam proses penemuan kandidat molekul obat. Berdasarkan hal di atas maka dilakukan penelitian *molecular dynamic* terhadap beberapa senyawa *C.vulgaris* yang memiliki nilai konformasi rendah dan berpotensi aktif pada proses regenerasi tulang.³⁶

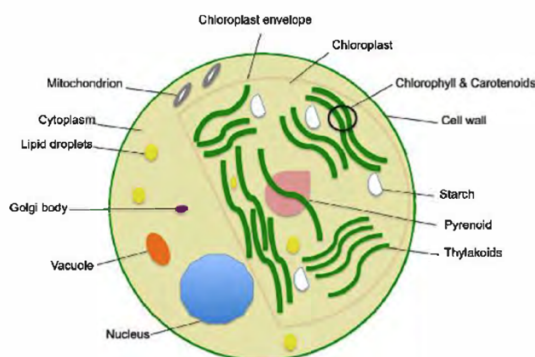
Chlorella vulgaris termasuk dalam spesies mikroalga dari kelompok Chlorophyta yang mengandung senyawa sitotoksik seperti flavonoid, tanin, senyawa fenolik, terpenoid, klorofil dan karotenoid.³⁷ Raga dkk melakukan penelitian untuk melihat aktivitas antioksidan dan antikanker microgreen alga *Chlorella vulgaris* dengan hasil *C. vulgaris* yang ditambah dengan tiamin memiliki efek antitumor yang tinggi secara in vitro.³⁸ Oleh karena itu perlu dilakukan uji sitotoksik dari ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris* dalam pengembangan senyawa baru *C.vulgaris* untuk mendukung regenerasi tulang.

Penelitian in silico molecular docking menjadi acuan penelitian *molecular dynamic* untuk melihat kestabilan ikatan senyawa aktif *Chlorella vulgaris* dengan protein marker regenerasi tulang. Selain itu dalam rangka pengembangan senyawa baru *C.vulgaris* untuk mendukung regenerasi tulang selain menggunakan uji in silico perlu dilakukan penelitian uji prediksi sifat fisikokimia dan uji prediksi toksisitas senyawa.

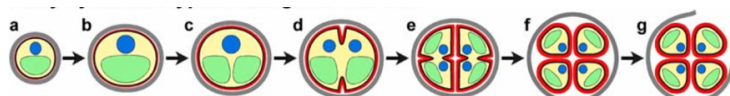
1.2. Teori

1.2.1 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris merupakan mikroalga hijau jenis klorofita yang berasal dari keluarga chlorellaceae (investigation). *Chlorella vulgaris* adalah sel mikroskopik berbentuk bulat dengan diameter 2 – 10 μm dan memiliki banyak elemen structural yang menyerupai tumbuhan. Mikroorganisme ini bereproduksi dengan cara membelah diri dan pembentukan spora.^{18,26}



Gambar 1. 1. Ultrastruktur *chlorella vulgaris*¹⁸



Gambar 1. 2. Fase reproduksi *chlorella vulgaris*³⁹

Pertumbuhan metabolisme *chlorella vulgaris* memiliki 4 tipe kategori, autotropik, heterotropik, miksotropik, dan fotoheterotropik. Karakteristik dari autotropik menggunakan sumber karbon anorganik berupa karbon dioksida, bikarbonat, dan cahaya sebagai sumber untuk berfotosintesis. Metabolisme ini memiliki dua kategori yaitu close system and open system. Pertumbuhan autotropik dengan open system merupakan cara yang paling sering dan mudah untuk menghasilkan biomassa dalam jumlah yang besar meliputi sumber air alami (seperti danau) dan sumber air artifisial (kolam). Kedalam kolam yang optimal sebaiknya 15 – 50 cm sehingga cahaya dapat mencapai seluruh lingkungan tumbuh *chlorella vulgaris*. Pengolahan microalgae dengan close system menggunakan beberapa tipe foto bioreactor seperti tubular, airlift, bubble coloumn dan photobioreactor.¹⁸

Metabolisme heterotropik memerlukan karbon organic sebagai sumber nutrisi dan energi sebagai pengganti cahaya, yang mana produk-produknya dihasilkan oleh fotobioreaktor tertutup. Metabolisme miksotropik

dapat terjadi dengan atau tanpa cahaya, serta menggunakan sumber karbon organik maupun anorganik.³⁹

Kultur mikсотropik berarti bahwa pertumbuhan sel tidak sepenuhnya bergantung pada fotosintesis, energi cahaya tidak lagi sebagai factor pembatas makadari itu cahaya dan sumber karbon organik memiliki peran dalam membantu metabolisme microalgae.⁴⁰ Pengolahan fotoheterotropik sangat membutuhkan tempat yang memiliki banyak sumber cahaya dan sumber karbon organik.^{26,40} *Chlorella vulgaris* merupakan sumber protein, vitamin dan mineral (potassium, sodium, magnesium, zat besi, kalsium dan acid) yang tinggi. Kandungan nutrisi mikroalga ini dipengaruhi oleh ukuran, bentuk, pencernaan, dan komposisi biokimia.^{17,18}

1.2.1.1 Kandungan utama dari *chlorella vulgaris*

1. Protein

Protein merupakan komposisi yang penting dalam ikatan kimia dan komposisi dari mikroalgae. Protein terlibat dalam peran penting seperti pertumbuhan, perbaikan dan pemeliharaan dari sel juga sebagai penggerak seluler, pembawa pesan kimia, regulator dari aktifitas sel dan pertahanan terhadap benda asing dari luar. Jumlah protein secara keseluruhan pada *C. vulgaris* dewasa sebanyak 42-58% dari berat biomassa kering, dan bervariasi berdasarkan kondisi pertumbuhannya.^{17,18}

2. Lemak

Selama pertumbuhan optimal dari *C. vulgaris* dapat mencapai 5-40% lemak per berat biomassa kering, dan kebanyakan terdiri dari glikolipid, wax, hidrokarbon, fosfolipid dan sedikit asam lemak bebas. Komponen tersebut disintesis oleh kloroplas dan berada pada dinding sel dan membrane dari organel (kloroplas dan membrane mitokondria).^{18,24}

3. Karbohidrat

Karbohidrat mewakili sekelompok gula preduksi dan polisakarida seperti pati dan selulosa. Pati merupakan polisakarida yang paling melimpah pada *C. vulgaris*. Umumnya berada di kloroplas dan terbentuk dari amylase dan amilopektin serta bersama dengan gula berfungsi sebagai sumber energy bagi sel. Selulosa merupakan polisakarida structural dengan resistensi tinggi, berada pada dinding sel dari *C. vulgaris* sebagai barrier fibrosa protektif.¹⁸

4. Klorofil

Klorofil adalah pigmen yang banyak pada *C. vulgaris*. Dapat mencapai 1-2% dari berat kering dan terletak pada tilakoid. Selain klorofil juga terdapat sejumlah karotenoid yang memiliki peran penting sebagai pigmen aksesoris dalam menangkap cahaya. Pigmen ini memiliki sifat terapeutik seperti antioksidan, regulasi kolesterol darah, efektif melawan degenerasi retina, mencegah dari penyakit kronik

seperti kardiovaskular dan kanker usus dan membentengi sistem imun.^{18,25}

Klorofil yang terkandung dalam *C.vulgaris* membantu dalam peningkatan produksi fibroblas yang berperan dalam penyembuhan luka. Klorofil merupakan derivat lipid yaitu produk yang dihasilkan oleh organisme maupun mikroorganisme yang aktif berfotosintesis. Klorofil dan karotenoid saling berkesinambungan dalam melakukan proses fotosintesis pada mikroalga. Pada *Chlorella*, klorofil yang dihasilkan ada lima yaitu klorofil a, b, c, d, dan e. Klorofil yang terkandung dalam *Chlorella* memiliki konsentrasi 0,05 - 0,5% dapat menginvasi dan memperbanyak fibroblas yang berguna dalam proses penyembuhan luka. Fibroblas akan menghasilkan kolagen yang membentuk sebagian dari jaringan granulasi yang terbentuk di daerah terjadinya luka.^{20,23}

5. Karotenoid

Karotenoid merupakan derivat lipid yang dihasilkan secara *de novo* oleh organisme fotosintetik. Kebanyakan ganggang hijau mempunyai komposisi karotenoid yang menyerupai tumbuhan tingkat tinggi. Karotenoid yang dominan antara lain β,β -karotena dan β,ϵ -karotena. Produk metabolit yang umum diketahui dari beta karotena ini adalah vitamin A.^{17,18}

6. *Chlorella* Growth Factor (CGF)

Chlorella sp menghasilkan senyawa bioaktif intrasel yang mampu menstimulasi pertumbuhan yang dikenal dengan istilah *Chlorella* Growth Factor (CGF). Senyawa bioaktif tersebut terdiri dari senyawa pemacu pertumbuhan ekstrasel dan intrasel. CGF adalah kelompok zat unik yang hanya ada di inti *Chlorella* yang menghasilkan hingga 18% dari total beratnya. CGF sangat kaya akan asam nukleat (RNA dan DNA) ditambah zat lain seperti asam amino, peptida, vitamin, mineral, polisakarida, glikoprotein, dan beta-glukan. Substansi yang terkandung dalam CGF meliputi berbagai unsur gizi seperti asam amino, gula, vitamin, mineral, dan asam nukleat. CGF 100% larut dalam air serta mempunyai kemampuan yang luar biasa untuk menyembuhkan dan meremajakan tubuh manusia, memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak, dan merangsang pertumbuhan sel-sel baru.^{23,39}

7. Mineral dan vitamin

Mineral yang terkandung dalam *C.vulgaris* terbagi menjadi yaitu Mikroelemen : Na, K, Ca, Mg, P dan Makroelemen : Cr, Cu, Zn, Mn, Se, I, Fe. b) Vitamin yang terkandung dalam *C.vulgaris* yaitu : B1 (Thiamin), B2 (Riboflavin), B3 (Niacin), B5 (Asam pantotenat), B6 (Pyridoxine), B9 (Asam Folic), B12 (Cobalamin), C (Asam askorbik), E (Tokoferol), A (Retinol).^{17,23}

1.2.1.2 Kandungan fitokimia *C.vulgaris*

Berdasarkan penelitian teknik screening menemukan bahwa *C.vulgaris* mengandung beberapa senyawa yaitu: flavonoid, tannin, senyawa fenol, terpenoid, cardiac glycosides, saponin, dan karbohidrat. Kandungan senyawa antimikroba di antaranya lakton, cyanogenicglycosides, senyawa sulfur, fenol, phenolicglycosides, saponin, dan fitolexin. Beberapa kandungan mineral pada *C.vulgaris* antara lain iodin, bromin, dan protein bioaktif.^{22,24}

1. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa fitokimia, termasuk tannin dan anthosianin. Aktivitas flavonoid adalah sebagai antioksidan, antiatherosklerotik, antiagregasi trombosit, antiulser, antiviral, antiinflamasi, antiarthritis, dan antidiare. Flavonoid juga memiliki efek antimikroba dengan target spektrum luas. Pada kulit, flavonoid dapat menghentikan pendarahan dari luka dan meningkatkan aktivitas vitamin C sebagai antioksidan.^{19,22}

2. Tokoferol

Tokoferol merupakan nama kimia dari vitamin E yang dikenal sebagai antioksidan, dan dipercaya oleh para pakar dapat mencegah penuaan pada sel-sel kulit akibat interaksi molekul radikal bebas dengan kulit. Vitamin E juga bermanfaat sebagai pencegah kanker, katarak, dan meningkatkan ketahanan tubuh dengan produksi antibodi secara terkontrol.¹⁷

3. Senyawa fenol

Senyawa fenol dapat mengatur kadar gula darah, sebagai antikanker, antioksidan, antimikroba, dan antiinflamasi.²⁴ Polifenol merupakan senyawa kimia antioksidan kuat. Polifenol berperan melindungi sel tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas sehingga mencegah proses inflamasi dan peradangan pada sel tubuh, serta menghambat penuaan dini. Polifenol juga bermanfaat menurunkan resiko penyakit degeneratif dan sebagai pengendali sinar ultraviolet terhadap kulit.^{17,24}

4. Terpenoid

Beberapa hasil penelitian menunjukkan senyawa terpenoid, yaitu 17 monoterpenoid linalool, diterpenoid, triterpenoid saponin, dan triterpenoid glikosida, memiliki aktifitas sebagai antibakteri. Selain itu, terpenoid juga bermanfaat menurunkan aktifitas inflamasi dari penurunan sintesis prostaglandin dalam tubuh.^{25,28}

5. Saponin

Saponin yang ditemukan dalam mikroalga memiliki beberapa aktivitas farmakologis, seperti antimikroba, antitumor, penurun kadar kolesterol, immune potentiating, dan antioksidan. Selain itu, saponin juga potensial dalam proses pembentukan kolagen, protein yang berperan dalam proses pemulihan luka.^{17,28}

6. Tannin

Tannin berfungsi sebagai antioksidan untuk mencegah kerusakan oksidatif DNA dengan dua cara, yaitu mengikat logam terutama besi dan secara langsung membasmi radikal bebas.¹⁷

7. Sterol

Sterol merupakan hasil biosintesis yang terjadi pada ganggang dan avertebrata. Pada mekanisme tertentu mulai dilakukan pengkajian mengenai biosintesis dan transformasi dari hormon steroid yang berpengaruh terhadap pergantian kulit.²³ Sterol adalah salah satu senyawa lipid yang besar pengaruhnya terhadap proses peradangan dan mencegah terjadi alergi berkepanjangan. Beberapa jenis sterol yang diekstraksi dari *C. vulgaris* mampu menghambat peradangan yang diinduksi dengan zat kimia tertentu pada kulit.^{23,25}

8. Senyawa sulfur

Menurut para peneliti, senyawa ini dapat bekerja sebagai antikanker, antioksidan, antimikroba, meningkatkan daya tahan tubuh, antiradang, mengatur tekanan darah, dan menurunkan kolesterol.^{17,25}

9. Omega-3 dan Omega-6

Merupakan senyawa asam lemak tak jenuh yang banyak terkandung dalam mikroalga, bahkan melebihi jumlah pada sebutir telur. Omega-3 dan Omega-6 berfungsi sebagai antioksidan alami, pengatur kadar kolesterol, mengatur kelancaran darah serta mencegah penyempitan pembuluh darah, sebagai prekursor sel otak yang mendukung kecerdasan otak, memperlambat penuaan sel produktif, dan dapat mencegah sel kanker.²⁴

10. Polisakarida

Polisakarida asam dari dinding sel *Chlorella* terbukti dapat merangsang sekresi interferon. Zat aktif lain yang terdapat pada *Chlorella*, disebut chlorellan, dapat menginvasi makrofag dan mendorong fagositosis.^{17,18}

11. Asam lemak

Suatu antibiotik yang dinamai chlorellin didapatkan dari pemotongan asam lemak tak jenuh rantai panjang yang terdapat dalam *Chlorella*.¹⁸

Table 1. Analisis komponen Chlorella kering per 100 gr¹⁸

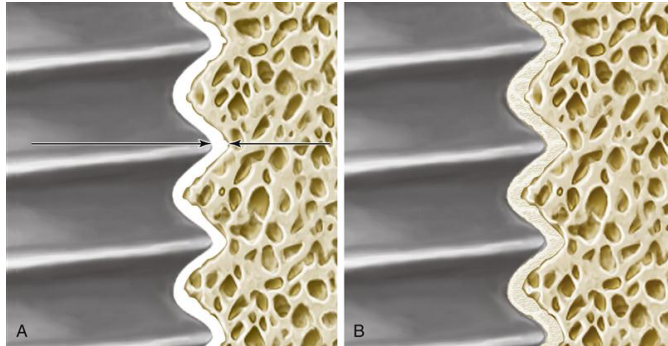
Komponen	Kandungan	
Protein	53-66	g
Lemak	6.15	g
Karbohidrat	10-20	g
Klorofil	1500-3000	mg
Karotin	10-80	mg
Zat Besi	80-200	mg
Kalsium	60-160	mg
Magnesium	150-500	mg
Vitamin A	5000-45000	I.U
Vitamin E	11-22	I.U
Vitamin B1	1-3	mg
Vitamin B2	2,5-7	mg
Vitamin B3	15-30	mg
Vitamin B6	0,6-2	mg
Vitamin B12	0,02-0,05	mg
Vitamin C	15-70	mg
Chlorella Growth Factor	12000-26000	mg

1.2.2 Osseointegrasi

Kata osseointegrasi terdiri dari “osteon” bahasa latin dari tulang dan “integrasi” diambil dari bahasa latin yang berarti keadaan yang digabungkan menjadi satu kesatuan yang lengkap.⁴¹ Menurut Branemark, osseointegrasi adalah hubungan langsung antara tulang hidup dan implan endosseous yang membawa beban pada tingkat mikroskopis cahaya.⁵ Menurut American Academy of Implant Dentistry, menyatakan kontak yang terjadi tanpa interposisi dari jaringan yang tidak bertulang antara pembentukan normal tulang dan implan yang memerlukan transfer berkelanjutan dan distribusi tekanan dari implan ke dan di dalam jaringan tulang.⁴² Dan menurut Glossary Prosthodontic Terms 9, osseointegrasi adalah perlekatan langsung yang jelas atau hubungan jaringan tulang terhadap bahan aloplastik lembam tanpa mengintervensi jaringan ikat.⁴³

Ikatan antara tulang yang baru terbentuk dengan implan disebut juga sebagai osseointegrasi, yaitu pembentukan kontak intim yang kuat antara permukaan implan dan jaringan tulang di sekitarnya. Antarmuka yang dihasilkan mampu menahan beban-beban normal maupun beban gigi tiruan yang dihasilkan selama mastikasi.⁴⁴ Osseointegrasi dapat dicapai jika jarak antar tulang dan implan tidak kurang dari 10 nm dan tidak mengandung jaringan fibrosa. Jika material implan dilapis maka terdapat dua antarmuka pada pelapis, yaitu bagian luar dan bagian dalam. Pelapis bersifat bioaktif, bagian luarnya akan menyatu dengan tulang di sekitarnya, sementara bagian dalam pelapis berikatan secara fisik dengan permukaan

implan logam. Hal ini disebut biointegrasi, dimana terdapat dua ikatan antarmuka pada kontak implan dan tulang.^{45,46}



Gambar 1. 3. Osseointegrasi dan biointegrasi⁴⁵

A. Pada osseointegrasi, material implan (kiri) berkontak dengan tulang (kanan). Kontak antara implan dan tulang harus mendekati 10 nm (tanda panah). B. Pada biointegrasi, implan logam dan tulang saling menyatu satu sama lain. Osseointegrasi umumnya terbentuk dengan titanium alloy, sedangkan biointegrasi terjadi pada keramik dan pada implan logam dengan pelapis keramik.

Osseointegrasi terbagi menjadi:

1. Osseointegrasi adaptif yaitu jaringan osseus yang mendekati permukaan implan tanpa antarmuka jaringan lunak yang terlihat pada tingkat mikroskopis cahaya.⁴⁷
2. Biointegrasi adalah perlekatan permukaan tulang biokimia langsung yang dikonfirmasi pada tingkat mikroskopis elektron. Zarb dan T. Albrektsson mendefinisikannya sebagai proses dimana fiksasi rigid asimtomatik secara klinis dari bahan aloplastik dicapai dan dipertahankan, dalam tulang selama pembebanan fungsional.^{5,48}

1.2.3 Remodeling tulang disekitar implan gigi

Setelah implan gigi terpasang, serangkaian respon imun-inflamasi yang diikuti oleh angiogenesis dan akhirnya osteogenesis terjadi untuk mencapai osseointegrasi. Hal ini dipengaruhi oleh karakteristik permukaan implan karena kemampuan adsorpsi protein berdasarkan topografi permukaan implan dan hidrofilitas.⁴⁹ Adapun fase yang terlibat dalam proses ini adalah fase homeostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling.⁵⁰

1. Fase homeostasis

Fase homeostasis atau disebut fase eksudat dimulai karena adanya trauma bedah akibat pengeboran implan yang diikuti pemasangan implan.

Durasi pada fase ini adalah beberapa menit hingga jam. Pelepasan beberapa sitokin BMP larut dan aktif pada lokasi tersebut. Perdarahan menyebabkan polimerisasi fibrinogen yang diprakarsai oleh trombosit dan dilakukan oleh trombin.⁴⁴ Sesaat setelah implantasi, permukaan implan berinteraksi dengan molekul air, ion dan protein plasma (albumin, globulin, dan fibrin). Melalui penyerapan protein, sel dapat menempel pada permukaan titanium seperti fibronectin yang mengandung lokasi pengikatan sel sehingga dapat berinteraksi dengan protein adhesi seluler yaitu integrin.^{51,52}

Pada lokasi tersebut, trombosit berkumpul dan membentuk trombus putih untuk menutup kebocoran vaskular dan menghasilkan trombin, ADP, kolagen, fibrinogen, dan trombospondin.⁵³ Vitronectin yang terdapat pada permukaan logam mengikat trombosit, sehingga menyebabkan trombosit aktif yang kemudian mengaktifkan integrin trombosit $\alpha\beta3$.^{51,54} Selanjutnya $\alpha\beta3$ berinteraksi dengan fibrinogen dan menghubungkan trombosit sehingga terbentuk sumbatan trombosit. Trombosit juga berikatan dengan kolagen dan reseptor glikoprotein spesifik untuk kolagen.⁵¹ Fibrin yang terikat dengan permukaan implan dapat mengikat trombosit melalui reseptor glikoprotein ke permukaan luar implan.⁵² Sehingga menghasilkan aktivasi dan degranulasi trombosit, dan serotonin menghasilkan vasokonstriksi. Pelepasan sitokin dari trombosit yang berdegranulasi menjadi awal fase inflamasi.^{52,55}

2. Fase inflamasi

Fase ini dimulai setelah sepuluh menit dan berlangsung selama beberapa hari pertama (sekitar 3-4 hari) paska pembedahan. Degranulasi trombosit melepaskan faktor pertumbuhan transforming growth factor beta (TGF- β), faktor pertumbuhan fibroblas, dan faktor pertumbuhan trombosit. Bradikinin dari trombosit meningkatkan permeabilitas pembuluh darah untuk cairan, protein serum, dan sel darah putih, sedangkan histamin meningkatkan aliran darah, menurunkan kecepatan aliran darah dan menginduksi hiperemia. Vasokonstriksi pada fase awal berubah menjadi vasodilatasi yang dapat dilihat secara klinis sebagai bengkak dan panas pada kulit di atas luka. Sistem imun bawaan diaktifkan oleh molekul tidak spesifik berasal dari bakteri. Sistem ini meliputi leukosit polimorfonuklear (PMN) dan makrofag.⁴⁴ Glikoprotein membentuk saluran perforasi membran (perforin) yang merusak sel bakteri dan mengikat glikoprotein bakteri agar dapat difagositosis oleh sel imun. PMN merusak pembuluh darah melalui migrasi amoeboid (masuk dari celah kecil di dinding pembuluh darah) atau disebut diapedesis.⁵¹ Diawali dengan ikatan lektin yang longgar dan dapat dibalik menyebabkan leukosit bergerak ke pinggir aliran darah, menempel dan melepaskan diri dan menggulung di sepanjang lapisan dalam pembuluh darah yang dimediasi oleh selektin

sehingga sel menempel.⁵² Adesi interselular menarik granulosit keluar dari aliran darah dan berikatan dengan intergrin pada leukosit.⁵⁴ Granulosit bermigrasi ke sel endotel, dan PMN yang menghasilkan etalase dan kolagenase membantu mencerna dan melewati lamina basalis pembuluh darah, dan selanjutnya migrasi diarahkan oleh kemotaksis.^{56,57}

PMN dan makrofag yang memproduksi zat kemotaktik berkontak dengan antigen, jika bertermu bakteri dalam jumlah besar maka akan menghasilkan PMN lebih banyak dengan melepaskan sitokin proinflamasi.^{51,54} PMN membunuh bakteri melalui radikal reaktif yang juga bersifat toksik bagi sel inang dan jaringan sehat di sekitar luka. Dengan demikian, respons granulosit neutrofil dapat menyebabkan hilangnya jaringan sehat di sekitarnya.^{27,55} PMN mengeluarkan enzim pencernaan seperti kolagenase dan elastase. Dalam lingkungan luka yang toksik, konsentrasi sitokin proinflamasi dan radikal toksik menjadi tinggi. Dalam kondisi ini, konsentrasi glikoprotein dan proteoglikan matriks ekstraseluler pelindung seperti fibronectin dan decorin menjadi rendah.^{53,55}

Fase inflamasi awal dalam 3 jam pertama cukup menentukan nasib luka selanjutnya. Jika bakteri harus dihilangkan, jumlah makrofag meningkat. Saat ada bakteri, makrofag mengeluarkan sitokin proinflamasi, tetapi mereka dapat bertindak sebagai pengatur untuk mengakhiri fase inflamasi.⁵¹ Sekresi growth factor dari makrofag meningkat dan konsentrasi fibronectin yang tinggi menyebabkan perlekatan fibroblas melalui ikatan integrin yang menyebabkan sel dapat masuk ke dalam luka, sehingga fase proliferasi dimulai.^{54,55}

3. Fase proliferasi

Fase ini dimulai dengan terbentuknya matriks ekstraseluler baru dan angiogenesis yang disebut jaringan granulasi. Fase ini terjadi sekitar beberapa hari hingga beberapa minggu.⁵⁵ Fibroblas dari jaringan sehat disekitarnya bermigrasi ke dalam bekuan darah. Bekuan fibrin mengeluarkan matriks metaloproteinase dan degradasi untuk membuka ikatan integrin dalam fragmen.⁵³

Selama fase ini, pertumbuhan vaskular terjadi dari jaringan vital di sekitarnya, suatu proses yang disebut neovaskularisasi. Metabolisme sel inflamasi lokal, fibroblas, sel progenitor dan sel lokal lainnya menciptakan area hipoksia relatif di area luka yang memicu sel mesenkim lokal berdiferensiasi menjadi fibroblas, osteoblas dan kondroblas.⁵⁷ Sel osteoprogenitor menempel pada permukaan luar implan melalui integrin. Integrin menempel pada protein matriks ekstraseluler seperti fibronectin melalui motif RGD.⁴⁴ Osteoblas tidak langsung menempel pada logam, tetapi pada lapisan protein di atas implan. Sel prekursor tulang itu sendiri menghasilkan fibronectin seluler yang tidak larut yang diperlukan untuk perlekatan seluler pada titanium.^{46,52,58} Setelah perlekatan yang kuat pada permukaan, sel osteoprogenitor yang menjadi aktif secara sekresi disebut

osteoblas. Sebagai penanda molekuler, osteoblas mulai mengekspresikan osteokalsin dan alkali fosfatase.^{56,59} Matriks ekstraseluler dibuat oleh sel-sel ini dan akhirnya terbentuk kalus fibro-kartilaginosa yang berubah menjadi kalus tulang.^{44,51}

Pembentukan tulang baru dimulai dengan sekresi matriks kolagen oleh osteoblas. Pembentukan tulang di dalam proses alveolar merupakan proses osifikasi intramembran, dimulai dengan sekresi kolagen tipe III.¹² Matriks ini kemudian dimineralisasi oleh hidroksiapatit. Proses mineralisasi selama pembentukan tulang primer berlangsung cepat, tetapi relatif tidak terorganisir dan tidak berhubungan erat dengan kolagen.^{12,54}

4. Fase remodeling

Pemegang kunci seluler dari fase remodeling adalah osteoklas yang muncul di luka setelah beberapa hari pasca pembedahan.⁵⁵ Remodeling dapat berlangsung beberapa tahun hingga tulang anyaman dan tulang lama digantikan dengan tulang baru yang terbentuk. Tulang yang terbentuk setelah remodelling adalah tulang pipih, tulang lamelar dan trabekula.^{47,53}

Osteoklas dan osteoblas bekerja secara interdependen. Aksi osteoklas bergantung pada osteoblas yang mengontrol osteoklastogenesis dengan keseimbangan antara RANKL dan rekannya osteoprotegerin, yang keduanya diproduksi oleh osteoblas.⁵³ Osteoblas mengeluarkan RANKL, ligan dari reseptor RANK (reseptor aktivator faktor nuklir kappa beta) yang mengaktifkan osteoklastogenesis. RANKL terikat pada membran dan dapat ditutupi oleh osteoprotegerin solubel yang juga disintesis oleh osteoblas dan merupakan reseptor umpan untuk RANKL.^{51,53}

Osteoprotegerin menjaga tulang dengan menghambat osteoklastogenesis. Rasio RANKL/ osteoprotegerin dapat dimodulasi, dan osteoblas merupakan target untuk berbagai molekul pembawa pesan yang meningkatkan dan menghambat tulang.⁴⁷ Osteoklas diperkirakan hidup rata-rata 12 hari pada manusia. Sel-sel pelapis tulang (osteoblas yang berdiferensiasi akhir) mencerna sisa-sisa osteoid oleh kolagenase dan dengan demikian membebaskan ujung peptida RGD dari protein matriks tulang non-kolagen seperti osteopontin.^{12,52}

Sel pelapis yang terlepas dari permukaan tulang menarik prekursor osteoklas yang bermigrasi. Selanjutnya menutup margin dengan cincin perlekatan integrin yang melekat pada protein matriks tulang osteopontin.⁵¹ Di antara osteoklas dan tulang, tercipta ruang lakuna untuk melindungi sel-sel di sekitarnya dari asam dan enzim yang agresif dan untuk membatasi tingkat resorpsi tulang.⁴⁹ Membran sel pada lipatan-lipatan tersebut mengandung pompa ion yang sebanding dengan pompa ion lambung. Memproduksi asam klorida, asam tersebut mendemineralisasi matriks tulang dan membebaskan kolagen tulang.^{44,47,57}

Pembentukan osteon baru dan renovasi tulang kortikal diatur dalam bentuk yang disebut cutting cone. Ini terutama berupa lingkaran ves- sel dengan beberapa osteoklas di ujungnya.⁵¹ Kelompok-kelompok osteoklas ini menggali terowongan ke dalam tulang yang lama. Tabung di belakang ujung terowongan dilapisi oleh lapisan konsentris tulang pipih yang baru terbentuk.⁵⁵ Pada keadaan akhir, unit yang baru terbentuk, yang mengandung pembuluh darah pusat disebut osteon atau sistem Haversian.^{47,49}

2.3.1. Protein biomarker osseointegrasi

1. Osteokalsin

Osteokalsin (OCN) adalah protein non kolagen yang masuk dalam komponen kandungan protein gamma-carboxyglutamic acid (Gla) yang merupakan salah satu kelompok penting dalam protein matriks ekstraselular.⁵⁷ OCN dihasilkan oleh osteoblas yang mengandung residu Gla, sehingga membuat OCN mampu mengikat kalsium untuk memodulasi metabolisme kalsium dengan memediasi hubungannya dengan hidroksiapatit. OCN secara rutin diukur dalam serum sebagai penanda pembentukan tulang osteoblastik dan dianggap bertindak dalam matriks tulang untuk mengatur mineralisasi tulang.^{57,60}

OCN atau yang biasa disebut juga GLA adalah asam amino 46-50 yang disekresikan 5,6 kDa yang diproduksi oleh osteoblas.⁶¹ Dalam jumlah yang kecil diproduksi oleh odontoblas gigi dan kondrosit hipertrofik. Protein ini sangat bergantung pada vitamin K yang kontituennya terlibat dalam koagulasi.⁶² OCN disekresikan ke dalam lingkungan mikro tulang dan kemudian mengalami perubahan bentuk yang menyesuaikan residu Gla pengikat ion kalsium dan hidroksiapatit. Sehingga memungkinkan OCN untuk memulai pembentukan kristal hidroksiapatit.⁶⁰

Salah satu mekanisme yang diusulkan di mana osteocalcin dianggap mengatur metabolisme glukosa adalah melalui pengikatan insulin pada reseptor spesifik pada osteoblas (sel pembentuk tulang) yang pada gilirannya menghambat ekspresi osteoprotegerin (OPG), protein yang bersirkulasi yang menghambat diferensiasi osteoklas (sel resorpsi tulang).^{60,63} Insulin bertindak sebagai penghubung molekuler utama antara remodeling tulang dan metabolisme energi dan bahwa peningkatan atau penurunan sinyal insulin pada osteoblas dapat meningkatkan atau menurunkan metabolisme glukosa dengan cara yang bergantung pada resorpsi tulang. Resorpsi tulang menghasilkan lingkungan asam yang memungkinkan terjadinya dekarboksilasi osteokalsin, melepaskan OC ke dalam sirkulasi untuk meningkatkan proliferasi sel b, sekresi insulin, dan kontrol glukosa.⁶⁰

2. Osteopontin

Osteopontin (OPN) adalah glikofosfoprotein terfosforilasi tinggi yang kaya akan asam aspartat dan memiliki karakteristik asam yang terdiri dari 300 asam amino dan termasuk oligosakarida ikatan-O dan ikatan-N.^{61,64} OPN protein matriks ekstraseluler pertama yang diidentifikasi dalam jaringan tulang adalah glikoprotein yang sangat terfosforilasi yang terdiri dari sekitar 314 asam amino dengan berat molekul berkisar antara 44 dan 75 kDa.⁶¹

OPN berperan penting dalam pembentukan tulang, peradangan, biomineralisasi, penyakit kardiovaskular, kelangsungan hidup sel, kanker, diabetes, dan penyakit batu ginjal melalui mekanisme yang berbeda.⁶⁴ Peningkatan adhesi sel tulang dengan berkonsentrasi pada matriks kolagen yang termineralisasi selama pembentukan jaringan tulang.^{61,65}

OPN berperan dalam penghancuran jaringan tulang melalui dua mekanisme dasar. Yang pertama adalah memberikan identifikasi dan kepatuhan sel osteoklastik oleh OPN yang dimediasi oleh integrin $\alpha\beta3$ dan yang kedua adalah modulasi fungsi osteoklastik melalui integrin $\alpha\beta3$.^{61,65} Selain itu, OPN dapat bertindak sebagai pembatas fisik yang membatasi pembentukan kristal pada tulang dan gigi.⁶⁴

3. *Runt-related transcription factor*

Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), juga dikenal sebagai core binding factor alpha1 (cbfa1), yang merupakan regulator transkripsi utama untuk penentuan nasib sel osteoblas. RUNX2 bertindak sebagai pengatur penting pembentukan tulang intramembran dan endokondral.⁵² Ekspresi RUNX2 pada fibroblas non-osteoblas cukup untuk menginduksi ekspresi penanda osteoblas seperti kolagen tipe1, sialoprotein tulang, osteocalcin, dan osteopontin.⁵⁴ Ekspresi RUNX2 pada progenitor osteokondral menekan diferensiasi kondrosit untuk meningkatkan diferensiasi osteoblas. Sebaliknya, penekanan RUNX2 mencegah diferensiasi sel mesenkim menjadi osteoblas.^{52,54}

Faktor transkripsi ini memainkan peran kunci dalam perkembangan tulang karena merupakan gen utama untuk diferensiasi osteoblas, mendorong langkah awal komitmen mesenkim menuju fenotipe pra-osteoblas. Kurangnya diferensiasi osteoblas menyebabkan tidak adanya pembentukan tulang, dan chondrocytes dari templat tulang rawan gagal mengalami hipertrofi, sementara ekspresi berlebih dari bentuk RUNX2 yang dominan-negatif pada osteoblas menghambat pembentukan tulang.⁵¹ Namun, ekspresi berlebih RUNX2 juga menyebabkan osteopenia, sehingga mengindikasikan bahwa faktor ini pada tingkat yang tidak tepat dapat menghambat proses pematangan osteoblas.^{52,54}

4. Bone morphogenic protein

Bone morphogenetic protein (BMP) adalah sitokin ekstraseluler multifungsi yang terlibat dalam banyak rangkaian molekuler dan jalur

sinyal.⁴⁶ Terdapat 30 Bone morphogenic protein (BMP) yang membentuk kelompok terbesar dari superfamili TGF (transforming growth factor)- β . Dinamakan demikian karena sifat osteoinduktifnya, dan mengatur diferensiasi sel mesenkim menjadi komponen tulang, tulang rawan, atau jaringan adiposa.⁶⁶ Di dalam tulang, beberapa ligan BMP disintesis dan disekresikan oleh osteoblas, kondrosit, dan progenitornya. Makrofag yang menyerang dan sel endotel vascular juga diketahui mengeluarkan BMP selama penyembuhan tulang.⁴⁴

Perannya sangat esensial dalam pembentukan tulang, mempengaruhi homeostasis osteoklas. BMP juga bertindak sebagai mediator dalam penggabungan osteoblas-osteoklas dan mempengaruhi laju remodeling tulang. Selain itu, peran BMP merangsang osteoprogenitor awal untuk memicu diferensiasi mereka menjadi sel pra-osteoblas.⁶⁷ Beberapa BMP yang merangsang diferensiasi osteoblas pada MSC secara in vitro dan in vivo adalah BMP2, BMP6, BMP7, dan BMP4. BMP2 dan BMP7.⁴⁴ Sedangkan beberapa BMP, seperti BMP3 dan BMP13, menghambat pembentukan tulang. BMP2 dapat menginduksi aktivasi ALP, penanda awal diferensiasi osteoblas dan sangat penting untuk osifikasi endokondral. BMP2 juga mengatur ekspresi regulator osteogenik kritis RUNX2.⁵²

Pensinyalan BMP kanonik dan non-kanonik mendorong pembentukan aktivitas osteoklas dan membantu diferensiasi dan aktivasi osteoklas secara langsung melalui sistem RANK, RANKL, dan atau OPG.⁴⁶ Selain itu, pensinyalan BMP dimediasi oleh pengikatan dimer ligan ke kompleks reseptor heteromer. Lingkungan reseptor BMP pada sel tulang sangat beragam. Terdapat tiga reseptor Tipe I (ACVR1, BMPR1A, dan BMPR1B) dan tiga reseptor Tipe II (BMPR2, ACVR2A, dan ACVR2B) yang diekspresikan oleh sel tulang.⁴⁴

Alur pensinyalan BMP melalui aktivasi protein Smad heterodimerik mengatur ekspresi RUNX2. Protein Smad adalah molekul pensinyalan intraseluler yang diaktifkan oleh ligan keluarga super TGF- β dan dikenali dalam tulang rawan lempeng pertumbuhan.⁴⁴ Smad6 tampaknya berperan dalam memblokir pensinyalan BMP, sedangkan Smad7 memblokir TGF- β dan BMP, dan Smad7 terlibat dalam menghambat pensinyalan yang bergantung pada TGF- β . Smad6 diperlukan untuk menghambat pengerasan endokondral. Hilangnya Smad6 menghasilkan peningkatan aktivitas kondrosit proliferasif dan hipertrofik dan dikaitkan dengan peningkatan produksi kolagen.⁵²

1.2.4 Uji Simulasi Molecular Dynamic (MD)

Dinamika molekuler adalah suatu bentuk simulasi komputer dimana atom dan molekul yang diizinkan untuk berinteraksi selama jangka waktu tertentu dengan pendekatan secara fisik yang diketahui, memberikan pandangan dari gerak dan partikel. *Molecular dynamics* merupakan

tahapan lebih lanjut dari pendekatan *molecular mechanic* dan didasari dari ide bahwa atom dari suatu molekul merasakan kekuatan untuk bergerak.⁶⁸ Simulasi secara virtual dapat digunakan untuk memahami sifat dari suatu molekul berdasarkan struktur dan interaksi mikroskopik antar molekul.

Keunggulan teknik dinamika molekuler yaitu dapat memberikan rute terhadap sifat dinamika dan suatu sistem seperti koefisien transport, respon terhadap gangguan yang bergantung pada waktu dan sifat rheologi. Simulasi dinamik ini secara virtual dapat melakukan pekerjaan yang mustahil untuk dilakukan secara nyata di laboratorium seperti bekerja pada suhu atau tekanan yang ekstrim.³⁰ Simulasi dinamika molekuler dapat digunakan dengan menggunakan beberapa aplikasi seperti Amber dan Gromac. Software lain yang dapat digunakan antara lain Chimera (Autodock Vina), Discovery Studio, NAMD, VMD, Toxtree, Marvin Sketch, dll. Webserver yang digunakan antara lain: Pubchem, Swiss ADME, ADMETlab, pKCSM, SmartCYP, dll.

Melalui simulasi dinamika molekuler yang dilakukan, maka informasi kinetika dan termodinamika suatu protein dapat ditelusuri lebih lanjut.⁶⁹

Aplikasi dan Metode yang digunakan:

1. Simulasi Molecular Dynamic (MD) dengan Aplikasi GROMACS versi 5.1.2

Tujuan dari Molecular Dynamic adalah untuk melihat kestabilan senyawa terbaik yang didapat dari hasil molecular docking.

2. Visualisasi Hasil Molecular Dynamic dengan Discovery studio versi 2024

Pada visualisasi ini digunakan aplikasi Discovery studio, yang bertujuan untuk melihat ikatan yang terjadi dan kemudian akan dibandingkan dengan hasil ikatan molecular docking.

1.3. Rumusan Masalah

- 1.2.1. Apakah terdapat kestabilan interaksi nilai RMSD, RMSF, dan RoG kompleks Osteopontin- (+)-(3S,4S)-N-Benzyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-methylenedioxy-4-2-propenyl)-1,2, kompleks Osteokalsin-Ethyl 2-(((3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl)methyl)benzoate, kompleks BMP-4 - Ethyl 2-(((3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl)methyl)benzoate, kompleks BMP-2 - pi.-Pentamethylcyclopentadienyl-germanium-(ii)-chlorid, dan kompleks RUNX-2 - 5.alpha.-Pregnan-20-one, 3.alpha,17-bis(trimethylsiloxy)-,o-methyl oxime melalui uji simulasi molekular dinamik.
- 1.2.2. Apakah senyawa (+)-(3S,4S)-N-Benzyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-methylenedioxy-4-2-propenyl)-1,2, Ethyl 2-(((3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl)methyl)benzoate, Ethyl2-(((3-cyano-4,6-dimethyl-2pyridinyl) sulfanyl] methyl) benzoate, pi.-Pentamethylcyclopentadienyl-germanium-(ii)-chlorid dan 5.alpha.-

Pregnan-20-one,3. alpha,17-bis(trimethylsiloxy)-,o-methyl oxime memiliki sifat fisikokimia yang baik ditunjukkan dengan terpenuhinya hukum lima lipinski secara in silico.

- 1.2.3. Apakah senyawa (+)-(3S,4S)-N-Benzyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-methylenedioxy-4-2-propenyl)-1,2, Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate, Ethyl2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2pyridinyl) sulfanyl] methyl) benzoate, pi.-Pentamethylcyclopentadienyl-germanium-(ii)-chlorid dan 5.alpha.-Pregnan-20-one,3. alpha,17-bis(trimethylsiloxy)-,o-methyl oxime memiliki toksisitas yang rendah dengan nilai LD₅₀ kelas V (2000 < LD₅₀ ≤ 5000 mg/kg) atau VI (LD₅₀ > 5000 mg/kg) secara in silico.

1.4. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

- 1.3.1.1. Mengetahui kestabilan interaksi nilai RMSD, RMSF, dan RoG kompleks Osteopontin- (+)-(3S,4S)-N-Benzyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-methylenedioxy-4-2-propenyl)-1,2, kompleks Osteokalsin-Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate, kompleks BMP-4 - Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate, kompleks BMP-2 - pi.-Pentamethylcyclopentadienyl-germanium-(ii)-chlorid, dan kompleks RUNX-2 - 5.alpha.-Pregnan-20-one,3. alpha,17-bis(trimethylsiloxy)-,o-methyl oxime melalui uji simulasi molekular dinamik.
- 1.3.1.2. Mengetahui sifat fisikokimia senyawa (+)-(3S,4S)-N-Benzyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-methylenedioxy-4-2-propenyl)-1,2, Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl) sulfanyl] methyl) benzoate, Ethyl2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2pyridinyl) sulfanyl] methyl) benzoate, pi.-Pentamethylcyclopentadienyl-germanium-(ii)-chlorid dan 5.alpha.-Pregnan-20-one,3. alpha,17-bis(trimethylsiloxy)-,o-methyl oxime dengan terpenuhinya hukum lima lipinski secara in silico.
- 1.3.1.3. Mengetahui prediksi toksisitas senyawa (+)-(3S,4S)-N-Benzyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-methylenedioxy-4-2-propenyl)-1,2, Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl) sulfanyl] methyl) benzoate, Ethyl2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate, pi.-Pentamethylcyclopentadienyl-germanium-(ii)-chlorid dan 5.alpha.-Pregnan-20-one,3. alpha,17-bis(trimethylsiloxy)-,o-methyl oxime dengan nilai LD₅₀ secara in silico.

1.3.2. Tujuan Khusus

- 1.3.2.1. Mengetahui dan menganalisis nilai RMSD, RMSF dan RoG hasil kompleks docking molecular *C.vulgaris* dengan 5 biomarker osteogenik afinitas terbaik (nilai ΔG nilai K_i terendah) terhadap lingkungan sekitarnya.
- 1.3.2.2. Mengetahui dan menganalisis prediksi sifat fisikokimia senyawa aktif *chlorella* yang memiliki ikatan afinitas tertinggi dengan biomarker osteogenik
- 1.3.2.3. Mengetahui dan menganalisis prediksi sifat toksisitas senyawa aktif *chlorella* yang memiliki ikatan afinitas tertinggi dengan biomarker osteogenik

1.5. Manfaat Penelitian**1.4.1. Manfaat Untuk Peneliti**

Penggunaan gel hidrofilik ekstrak *C.vulgaris* secara karakteristik biomaterial dan kemampuan dalam regenerasi tulang

1.4.2. Manfaat Praktisi

Dapat dikembangkan untuk menjadi alternatif biomaterial untuk regenerasi tulang yang digunakan sebagai bahan pelapis perawatan implan gigi

1.4.3. Manfaat untuk Masyarakat

Informasi yang bermanfaat kepada masyarakat mengenai biomaterial yang dapat digunakan dalam perawatan implan gigi

1.4.4. Manfaat ilmu pengetahuan

Menjadi penelitian dasar mengenai biomaterial yang baru dalam regenerasi tulang dalam perawatan implan gigi

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah true eksperimental laboris secara in silico.

2.2. Tempat penelitian

Lokasi penelitian uji simulasi *molecular dynamic* dan uji sitotoksisitas dilakukan di Labolatorium Kimia Farmasi Universitas Hasanuddin.






2.3. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dalam kurun waktu Maret 2024 - Mei 2024

2.4. Sampel Penelitian

Sampel penelitian pada penelitian uji in silico molecular dinamik dan prediksi toksisitas adalah hasil uji molecular docking *C.vulgaris* dengan 5 biomarker osteogenik (osteokalsin, osteopontin, BMP-4, BMP-2 dan RUNX-2) yang memiliki afinitas terbaik (nilai ΔG nilai K_i terendah).

Table 2. Kompleks ligan-protein yang memiliki nilai afinitas ikatan paling negatif dari hasil simulasi docking

No	Ligan	PubChem ID	Kode SMILES	Protein Osteogenik	Afinitas ikatan (kcal/mol)
1.	 (+)-(3S,4S)-N-Benzyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-methylenedioxy-4-2-propenyl)-1,2	-	<chem>COC1=C(OC)C=C(C=C1)C1C(CC=C)C2=C(CN1CC1=CC=CC=C1)C=C1OCOC1=C2</chem>	Osteopontin	-6,076
2.	 Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate	624423	<chem>CCOC(=O)C1=CC=CC=C1CSC2=C(C(=CC(=N2)C)C)C#N</chem>	Ostokalsin	-4,478
3.	 Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate	624423	<chem>CCOC(=O)C1=CC=CC=C1CSC2=C(C(=CC(=N2)C)C)C#N</chem>	BMP-4	-4,624
4.	 pi.-Pentamethylcyclopentadienyl-germanium-(ii)-chlorid	577059	<chem>CC1=C(C2(C3(C1([Ge]23Cl)C)C)C)C</chem>	BMP-2	-5,07
5.	 5.alpha.-Pregnan-20-one,3.alpha,17-bis(trimethylsiloxy)-,o-methyl oxime	91697101	<chem>CC(=NOC)C1(CCC2C1(CCC3C2CCCC4C3(CCC(C4)O[Si](C)(C)C)C)O[Si](C)(C)C</chem>	RUNX-2	-5,7

2.5. Alat dan Bahan

Perangkat Keras

Seperangkat komputer Processor 13th Gen Intel (R) Core (TM) CPU i9-13900KF 3.00 GHz Installed RAM 128 GB , 64-bit operating System.

Perangkat Lunak

GROMACS, Discovery Studio dan PyMol

2.6. Alur Penelitian

Uji Simulasi Molecular Dynamic

Simulasi dinamika molekul antara *C.vulgaris* dengan 5 biomarker osteogenik senyawa uji terbaik hasil simulasi docking³⁵ dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Gromacs v.2023.4. Tujuan dilakukannya simulasi dinamika molekul ialah untuk mengkaji kestabilan interaksi protein dengan ligan dalam kondisi yang dibuat semirip mungkin dengan fisiologis tubuh manusia dalam rentang waktu tertentu.

Simulasi dinamika molekul ligan dan protein regenerasi tulang dilakukan dengan program gromacs. Simulasi dinamika molekul dilakukan dengan beberapa tahapan yakni persiapan berkas masukan, pembuatan koordinat dan topologi ligan, minimisasi, ekuilibrasi, produksi, dan analisis.

Tahap Pertama yaitu persiapan berkas masukan.

Simulasi dinamika molekul memerlukan berkas masukan yang harus disiapkan terlebih dahulu meliputi persiapan makromolekul dan molekul ligan. Ligan yang digunakan pada simulasi dinamika molekul adalah 5 ligan dengan nilai afinitas ikatan paling negatif dari hasil simulasi docking.

Tahapan kedua adalah pembuatan topologi dan koordinat ligan.

Tahapan ini dilakukan agar simulasi berlangsung pada posisi yang tetap dan tidak ada perubahan struktur dari atom-atom backbone residu maupun ligan. Pada tahap ini juga dilakukan penambahan counter-ions (Ion Na⁺ & ion Cl⁻) untuk membuat sistem menjadi netral dan seluruh sistem dilarutkan pada model air TIP3P dalam kotak oktahedron untuk mengefisienkan waktu simulasi dan jarak kotak minimal 12 Å yang merupakan jarak standar yang digunakan pada program ini.⁷⁰

Tahap ketiga yakni tahap minimisasi energi

Tahapan ini dilakukan untuk merelaksasi sistem dan dilakukan dalam dua tahapan: tahap pertama merupakan minimisasi terhadap molekul air saja, dan tahap kedua merupakan minimisasi terhadap seluruh sistem yaitu ligan dan molekul air. Tujuan minimisasi energi untuk menghindari bentrokan antar atom ketika terjadi proses penambahan dan pemutusan ikatan hidrogen.

Pada tahap ini sistem dibuat dalam keadaan konstan baik temperatur, volume dan tekanan.⁷¹ Tahap ekuilibrasi dilakukan dalam 3 tahapan. Pada tahapan pertama, dilakukan ekuilibrasi untuk membuat volume yang konstan dan menaikkan suhu dari 0 K menjadi 300 K. Ekuilibrasi tahapan kedua dan ketiga dilakukan untuk membuat seluruh sistem berada pada suhu dan tekanan yang konstan.

Tahap keempat yaitu tahap produksi

Pada tahap ini simulasi dinamika molekul mulai dijalankan. Simulasi yang dilakukan selama 100 ns (nanosecond), dalam simulasi terdapat 50.000 frame konformasi kompleks protein – ligan.

Prediksi sifat fisikokimia dan toksisitas secara in silico

Prediksi sifat fisikokimia dan toksisitas secara in silico dilakukan dengan mencari kode SMILES dari situs Pubchem (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) . Dalam bentuk format SMILES inilah senyawa diproses menggunakan pkCSM online tool (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) untuk memprediksi sifat fisikokimia senyawa dan mendapatkan parameter untuk diklasifikasikan kedalam Hukum Lima Lipinski . Untuk memprediksi toksisitas (LD_{50}), klasifikasi toksisitas senyawa berdasarkan Globally Harmonized System (GHS) digunakan Protox online tool (http://tox.charite.de/protox_II) dan toksisitas senyawa berdasarkan skin sensitization, Ames toxicity, Hepatotoxycity didapatkan melalui pkCSM online tool.

2.7. Metode Analisis Data

Analisis molecular dynamic dilakukan dengan analisis grafik RMSD (Root Mean Square Deviation), analisis grafik RMSF (Root Mean Square Fluctuation) dan analisis grafik RoG (Radius of gyration).

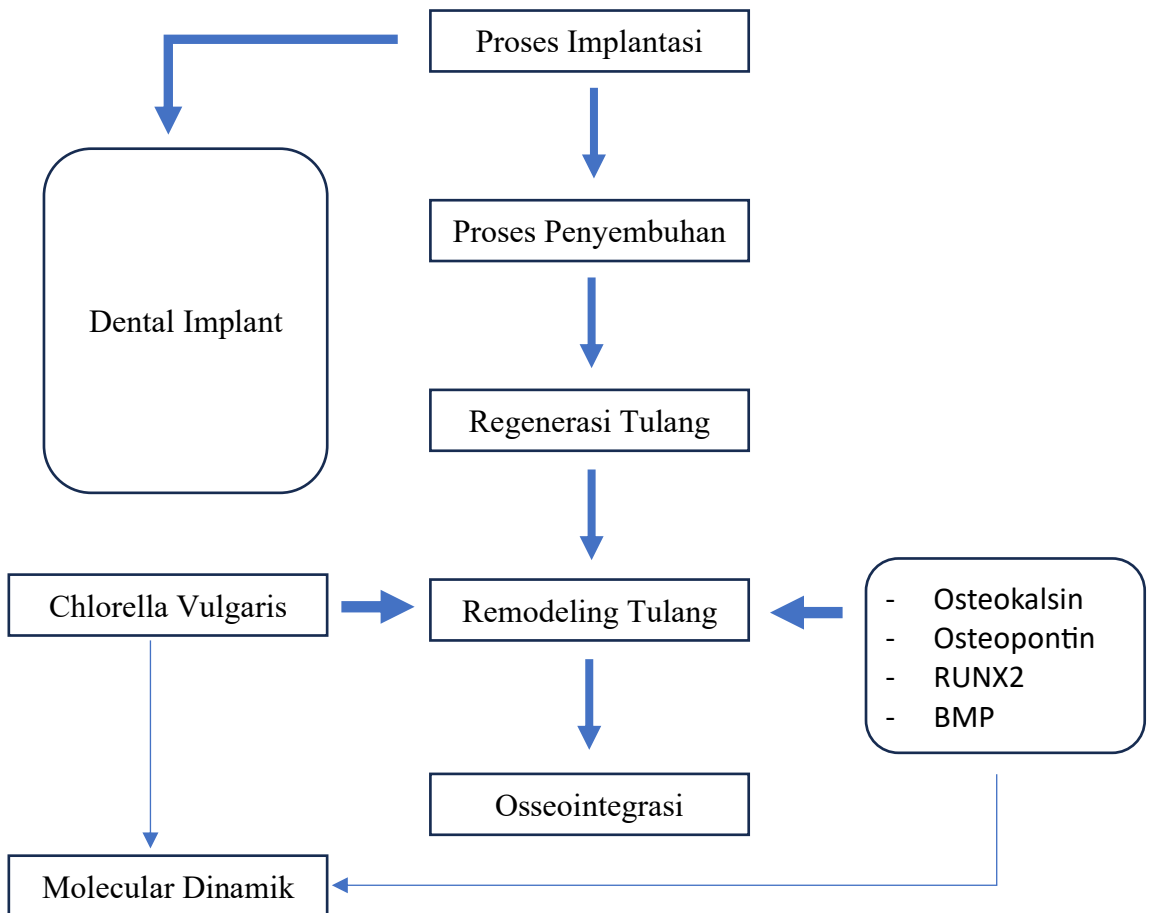
Analisis data prediksi sifat fisikokimia dengan mengetahui berat molekul (BM), jumlah donor ikatan hidrogen, akseptor ikatan hidrogen dan logaritma koefisien partisi oktanol/air (Log P), Lima aturan lipinski harus dipenuhi suatu molekul supaya bisa dijadikan kandidat obat. Analisis data toksisitas dikategorikan berdasarkan nilai LD_{50} dan ditentukan kelas toksisitasnya menggunakan Protox II online tool.

2.8. Definisi Operasional

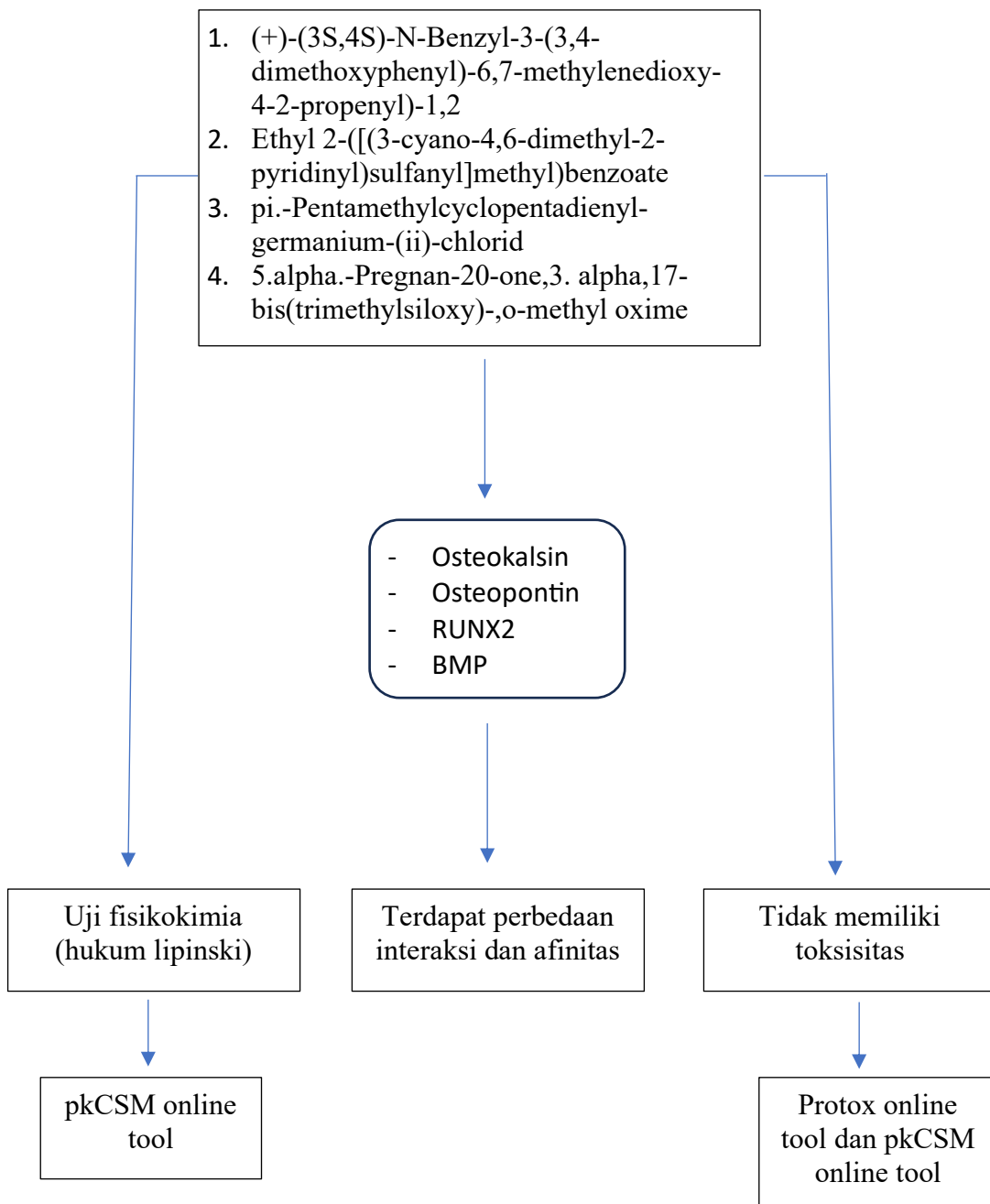
No	Variabel	Defenisi Operasional	Cara Pengukuran	Hasil Pengukuran	Skala
1.	Uji Molecular dynamic	Suatu bentuk simulasi komputer dimana atom dan molekul yang diizinkan untuk berinteraksi selama jangka waktu tertentu dengan pendekatan secara fisik yang diketahui.	menggunakan perangkat lunak Gromacs v.2023.4 Visualisasi Hasil Molecular Dynamic dengan Discovery studio versi 2019 dan PyMol	analisis grafik RMSD (Root Mean Square Deviation), analisis grafik RMSF (Root Mean Square Fluctuation) dan Analisis grafik RoG (Radius of Gyration)	Numerik
2.	Prediksi sifat fisikoimia Lipinski's rule of five	Parameter fisikokimia yang sesuai dengan aturan Lipinski ditentukan untuk mengamati permeabilitas obat dalam melakukan difusi pasif terhadap lipid bilayer pada tubuh target.	parameter untuk dikasifikasikan kedalam Hukum Lima Lipinski. bobot molekul ≤ 500 g/mol, jumlah donor ikatan hidrogen ≤ 5 , akseptor ikatan hidrogen ≤ 5 , $\log P \leq 5$	Tidak terpenuhi Jika senyawa memiliki lebih dari satu parameter yang tidak memenuhi standart Lipinski.	Numerik

3.	Uji Prediksi toksisitas in silico	laboratorium virtual untuk memprediksi toksisitas dari molekul yang sangat kecil	berdasarkan nilai LD ₅₀ dan ditentukan kelas toksisitasnya menggunakan Protox II online tool	Klasifikasi toksisitas senyawa berdasarkan Globally Harmonized System (GHS), kelas I : fatal jika tertelan (LD ₅₀ ≤ 5 mg/kg), kelas II : fatal jika tertelan (5 < LD ₅₀ ≤ 50 mg/kg), kelas III : beracun jika tertelan (50 < LD ₅₀ ≤ 300 mg/kg), kelas IV : berbahaya jika tertelan (300 < LD ₅₀ ≤ 2000 mg/kg), kelas V : bisa berbahaya jika tertelan (2000 < LD ₅₀ ≤ 5000 mg/kg), kelas VI: tidak beracun (LD ₅₀ > 5000 mg/kg).	Numerik
----	-----------------------------------	--	---	---	---------

2.9. Kerangka Teori



2.10. Kerangka Konsep



2.11. Hipotesis

1. Terdapat kestabilan interaksi nilai RMSD, RMSF, dan RoG kompleks Osteopontin- (+)-(3S,4S)-N-Benzyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-methylenedioxy-4-2-propenyl)-1,2, kompleks Osteokalsin-Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate, kompleks BMP-4 - Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl) sulfanyl] methyl) benzoate, kompleks BMP-2 - pi.-Pentamethylcyclopentadienyl-germanium -(ii)-chlorid, dan kompleks RUNX-2 - 5. alpha. -Pregnan-20-one,3. alpha,17-bis(trimethylsiloxy)-,o-methyl oxime melalui uji simulasi molekular dinamik.
2. Senyawa (+)-(3S,4S)-N-Benzyl-3- (3,4-dimethoxyphenyl)- 6,7-methylenedioxy -4-2-propenyl)-1,2, Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl) sulfanyl] methyl) benzoate, Ethyl2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2pyridinyl) sulfanyl] methyl) benzoate, pi.-Pentamethylcyclopentadienyl- germanium-(ii) -chlorid dan 5.alpha.-Pregnan-20-one,3. alpha,17-bis(trimethylsiloxy)-,o-methyl oxime memiliki sifat fisikokimia yang baik ditunjukkan dengan terpenuhinya hukum lima lipinski secara in silico.
3. Senyawa (+)-(3S,4S)-N-Benzyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-methylenedioxy-4-2-propenyl)-1,2, Ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl) sulfanyl] methyl) benzoate, Ethyl2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2pyridinyl) sulfanyl] methyl) benzoate, pi.-Pentamethylcyclopentadienyl- germanium-(ii)-chlorid dan 5.alpha.-Pregnan-20-one,3. alpha,17-bis(trimethylsiloxy)-,o-methyl oxime memiliki toksisitas yang rendah dengan nilai LD₅₀ kelas V (2000<LD₅₀ ≤ 5000 mg/kg) atau VI (LD₅₀ >5000 mg/kg) secara in silico.