

DISERTASI

**POTENSI EKSTRAK KULIT BATANG *Mangifera casturi* 12,7 %
TERHADAP KADAR HMGB-1, VEGF, BMP-6, OSTEOKALCIN SELAMA
PROSES REGENERASI TULANG**

*POTENTIAL OF Mangifera casturi stem bark extract 12.7 % ON THE
LEVELS OF HMGB-1, VEGF, BMP-6, OSTEOCALCIN DURING
THE BONE REGENERATION PROCESS*



Bayu Indra Sukmana

C013182021

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

DISERTASI

**POTENSI EKSTRAK KULIT BATANG *Mangifera casturi* 12,7 %
TERHADAP KADAR HMGB-1, VEGF, BMP-6, OSTEOKALSIK
SELAMA PROSES REGENERASI TULANG**

Disusun dan diajukan oleh

**BAYU INDRA SUKMANA
C013182021**

*Telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Ujian dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal 17 Februari 2022
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

Menyetujui

Promotor


Prof. Dr. drg. Hasanuddin Thahir, MS, Sp.Perio(K)
NIP. 195811101986091002

Co Promotor

Co Promotor


Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K) Prof. Dr. drg. Muh. Harun Ahmad, M. Kes, Sp. GKA(K)
NIP. 195704161985031001 NIP. 197105232002121002

Ketua Program Studi Doktor
Ilmu Kedokteran,

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,


dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp. GK(K) Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp. M(K), M. Med. Ed
NIP. 19700821 199903 1 001 NIP. 19661213 199503 1 009



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Bayu Indra Sukmana
NIM : C013182021
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

POTENSI FRAKSI KULIT BATANG *Mangifera casturi* 12,7 % TERHADAP EKSPRESI HMGB-1, VEGF, BMP-6, OSTEOKALSIIN SELAMA PROSES REGENERASI TULANG

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 5 Januari 2022

Yang menyatakan,



Bayu Indra Sukmana

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT dan sholawat tercurah kepada baginda Rasul Muhammad SAW bahwa atas restu dan karunia-Nya sehingga penyusunan disertasi dengan judul “Potensi Ekstrak Kulit Batang Mangifera Casturi 12,7% terhadap Kadar HMGB-1, VEGF, BMP-6, Osteokalsin Selama Proses Regenerasi Tulang” dapat terselesaikan dengan baik dan lancar. Penulis menyadari sepenuhnya disertasi ini dapat diselesaikan berkat bantuan, bimbingan, arahan, saran, koreksi dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis ingin menghanturkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

1. Prof. Dr. drg. Hasanuddin Thahir, MS, Sp.Perio(K) selaku promotor yang senantiasa memotivasi, membimbing, mendorong dan meluangkan waktu di tengah kesibukan bagi penulis sejak awal penelitian ini hingga pada akhir penulisan disertasi ini.

2. Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K) selaku ko-promotor dengan penuh kesabaran memberi semangat, motivasi, ide-ide, merangkul dan membantu sejak awal penelitian hingga selesainya disertasi ini.

3. Prof. Dr. drg. Muh. Harun Ahmad, M.Kes, Sp.GKA(K), selaku ko-promotor dengan penuh perhatian dan penuh kesabaran memberi semangat, motivasi, ide-ide, merangkul dan membantu sejak awal penelitian hingga selesainya disertasi ini.

4. Dr. dr. Agung Dwi W.W, M.Si, Klin, Sp.MK, selaku penguji yang sangat berkompeten dibidangnya yang telah memberikan dukungan sejak awal penelitian dan mendukung sebagai ketua PDPI Pusat untuk terlaksananya penelitian ini.

5. Prof. Dr. Elly Wahyuddin, DEA, Apt, dr. Sitti Wahyuni, Ph.D, Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS, dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, SP.GK(K), Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes, selaku penguji yang berkompeten dibidangnya yang tidak lelah memberikan masukan, saran-saran dan nasehat yang sangat berguna bagi penyempurnaan disertasi ini.

6. Terima kasih kepada Rektor Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, MPH, Rektor Universitas Lambung Mangkurat Prof. Dr. H. Sutarto Hadi, M.Si., M.Sc.

7. Terima kasih buat Wakil Rektor I ULM Bidang Akademik : Prof. Dr. Aminuddin Prahatama Putra, M.Pd.

8. Terima kasih buat Ketua Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K) beserta staf Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran atas bantuannya selama proses pendidikan.

9. Khusus untuk istri tercinta dan anakku yang selalu memberikan dukungan, semangat, dan doa serta pengorbanan yang sangat besar dengan penuh kesetiaan dan pengertiannya mendampingi penulis menyelesaikan penelitian dan pendidikan ini.

10. Orang tua tercinta yang terus memberikan dukungan moril, doa dan semangat untuk penulis untuk menyelesaikan penelitian dan pendidikan ini.

11. Terima kasih buat seluruh teman angkatan 2018 Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran FK Unhas

12. Seluruh saudara kandung dan kak ipar, tante dan om, sepupu serta ponakan yang telah mendukung saya untuk menyelesaikan pendidikan ini.

13. Ucapan terimakasih dan penghargaan juga disampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sampaikan satu demi satu yang telah dengan tulus serta segenap hati membantu saya sejak awal hingga akhir terselesaikannya proses pendidikan dan penelitian ini.

Saya juga menghanturkan maaf sebesar-besarnya apabila terdapat kesalahan dalam penyusunan disertasi ini. Semoga Disertasi ini dapat dijadikan panduan dan bermanfaat bagi banyak orang.

Makassar, 18 Februari 2022

Bayu Indra Sukmana

ABSTRAK

BAYU INDRA SUKMANA. *Potensi Fraksi Kulit Batang Mangifera casturi 12,7% terhadap Ekspresi HMGB-1, VEGF, BMP-6, Osteokalsin Selama Proses Regenerasi Tulang* (dibimbing oleh Hasanuddin Tahir, Mochammad Hatta, dan Muh. Harun Ahmad).

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui potensi fraksi kulit batang *Mangifera casturi* 12,7% terhadap ekspresi *high mobility group box* (HMGB-1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *bone morfogenik Protein-6* (BMP-6), dan osteokalsin selama regenerasi tulang setelah pencabutan gigi.

Penelitian ini menggunakan 32 tikus jantan putih (*Rattus norvegicus*) dengan berat 250-300 gram. Kemudian, tikus dibagi menjadi empat kelompok secara acak dan setiap kelompok terdiri atas 8 ekor. Kelompok 1 sebagai kontrol sehat (osteotomi dan diukur pada hari pertama), kelompok 2 dan 3 diberi ekstrak kulit batang *Mangifera casturi* 12,7% setelah osteotomi dan diukur pada hari ke-14 dan ke-28. Kelompok 4 sebagai kontrol positif (osteotomi dan *bone graft*) diukur pada hari ke-28. HMGB-1, VEGF, BMP-6, dan osteokalsin diukur melalui serum tikus dengan menggunakan ELISA.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat peningkatan jumlah HMGB-1 setelah diberikan ekstrak *Mangifera casturi* 12,7%. Nilai HMGB-1 pada hari ke-1, 7, dan 28 menurun, baik di kelompok osteotomi maupun kelompok osteotomi + pemberian ekstrak. Terdapat peningkatan jumlah *osteocalcin* setelah diberikan ekstrak *Mangifera casturi* 12,7%, *osteocalcin* pada hari ke-1, 7, dan 28 meningkat, baik di kelompok osteotomi maupun kelompok osteotomi + pemberian ekstrak.

Kata kunci: BMP-6, HMGB-1, kasturi, osteokalsin, regenerasi, VEGF



ABSTRACT

BAYU INDRA SUKMANA. *The Potency of Stem Bark Fraction of Mangifera Kasturi 12.7% on the Expression of HMGB-1, VEGF-6, and Osteocalcin During the Process of Bone Regeneration* (supervised by **Hasanuddin Thahir, Mochammad Hatta, and Muh Harun Ahmad**)

The aim of this research is to determine the potency of stem bark fraction of mangifera casturi 12.7% on the expression of HMGB1, VEGF, BMP-6, and osteocalcin during bone regeneration after tooth extraction. Kasturi (*Mangifera casturi*) is one of the typical plants of South Borneo. The bark of Kasturi is known to contain several phytochemical compounds such as tannin as the highest one followed by saponin, steroid, and flavonoid. These secondary metabolites play an important role in healing process after tooth extraction. There are several mediators that play an important role in bone healing process such as HMGB1 (High Mobility Group Box 1), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), BMP-6 (Bone Morphogenic Protein-2), and osteocalcin.

Thirty-two white male rats (*Rattus norvegicus*) with 250-300 grams were used as the subjects. They were divided randomly into four groups, eight rats in each group. Group 1 was a healthy control (osteotomy and measured at the first day); groups 2 and 3 were given 12.7% of stem bark extract of casturi mango after osteotomy and measured on day 14 and 28. Group 4 as a positive control (osteotomy and bone graft) was measured on day 28. HMGB1, VEGF, BMP-6, and osteocalcin was measured by rat serum using ELISA.

The results indicate that there is an increase in the number of HMGB1 after mangifera casturi extract is given 12.7%, in which the value of HMGB1 on day 1, 7, and 28 decreases both in the osteotomy! group and in the osteotomy group + extract administration. There is an also increase in the amount of osteocalcin after mangifera casturi extract is given 12.7%, in which the osteocalcin on day 1, 7, and 28 increases both in the osteotomy group and in the osteotomy group + extract administration.

Key words: BMP-6, HMGB1, casturi, osteocalcin, regeneration, VEGF.



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	iii
PRAKATA	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.2.1 Tujuan Umum	3
1.2.3 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat	4
1.3.1 Teori	4
1.3.2 Praktis	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tulang Alveolar	5
2.1.1 Definisi	5
2.2 Formasi Tulang	5
2.2.1 Matriks Tulang	6
2.2.2 Proses Penyembuhan Tulang	7
2.2.2.1 Fase Inflamasi	7
2.2.2.2 Fase Proliferasi	8
2.2.2.3 Fase Regenerasi/Remodeling	9
2.3 Tumbuhan Kasturi	12
2.3.1 Uji Fitokimia Ekstrak kulit batang <i>Mangifera casturi</i>	14
2.3.2 Stabilitas <i>Mangifera casturi</i>	17

2.3.3 Anatomi dan Pengujian kulit batang <i>Magifera casturi</i>	17
2.4 Metabolit Sekunder dalam Kasturi	20
2.5 Bonegraft	20
2.6 HMGB-1	21
2.6.1 Aktivasi HMGB-1	26
2.7 VEGF	28
2.8 BMP-6	33
2.9 Osteokalsin	37
2.10 Gel Ekstrak <i>Mangifera casturi</i>	41
2.11 Kerangka Teori	42
2.12 Kerangka Konsep	45
2.13 Hipotesa	45
BAB 3 METODE PENELITIAN	46
3.1 Rancangan Penelitian	46
3.2 Populasi dan Sampel	46
3.2.1 Populasi	46
3.2.2 Teknik Pengambilan Sampel	47
3.2.3 Jumlah Sampel	47
3.2.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	49
3.3 Variabel Penelitian	49
3.3.1 Variabel Bebas	49
3.3.2 Variabel Terikat	49
3.3.3. Variabel Terkendali	49
3.4 Definisi Operasional	50
3.5 Tempat dan Waktu Penelitian	52
3.6 Alat dan Bahan	52
3.6.1 Alat	52
3.6.2 Bahan	53
3.7 Prosedur Penelitian	53
3.7.1 Persiapan Bahan Ekstrak Kulit Batang Mangga Kasturi (<i>Mangifera casturi</i>)	53

3.7.2 Pembuatan Suspensi Ekstrak Klit Batang Mangga Kasturi (<i>Mangifera casturi</i>)	54
3.7.3 Hewan	54
3.7.4 Protokol Pengeburan Tulang	54
3.7.5 Pemberian Ekstrak Kulit Batang <i>Mangifera casturi</i>	55
3.7.6 Preparasi Sampel	55
3.7.7 Prosedur Pengujian HMGB-1	55
3.7.8 Prosedur Pengujian BMP-6	58
3.7.9 Prosedur Pengujian Osteokalsin	61
3.7.10 Prosedur Pengujian VEGF	63
3.8 Alur Penelitian	66
3.9 Tahap Pengamatan dan Pengambilan Data	67
3.10 Pengambilan dan Pengumpulan Data	67
3.11 Cara Pengolahan dan Analisis Data	67
BAB 4 HASIL PENELITIAN	68
4.1 HMGB-1	70
4.2 Osteokalsin	74
4.3 BMP-6	78
4.4 VEGF	83
BAB 5 PEMBAHASAN	88
BAB 6 PENUTUP	103
6.1 Kesimpulan	103
6.2 Saran	104
DAFTAR PUSTAKA	105
LAMPIRAN GAMBAR PENELITIAN	116
DAFTAR SINGKATAN	119

BAB I

PENDAHULUAN

1.1.1 Latar Belakang

Kasturi (*Mangifera casturi kosterm*) merupakan suatu jenis tanaman yang termasuk dalam genus magifera, tanaman ini merupakan endemik yang tumbuh khas di daerah Kalimantan Selatan. Masyarakat Kalimantan Selatan memanfaatkan buahnya untuk dimakan, di mana buah kasturi memiliki rasa yang manis dan aroma yang khas. Daun, batang, akar dan daun kasturi memiliki senyawa aktif sehingga berpotensi menjadi obat. Berdasarkan uji fitokimia, kulit batang Kasturi diketahui memiliki senyawa metabolit sekunder seperti tanin, saponin, steroid dan flavonoid yang berperan penting dalam proses penyembuhan setelah pencabutan gigi (Santi, et.al. 2016; Sutomo, et.al. 2019)

Tingginya prevalensi pencabutan gigi merupakan masalah klasik di Indonesia, termasuk Kalimantan Selatan. Berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar tahun 2007 di bidang kesehatan gigi dan mulut, prevalensi pencabutan gigi di Provinsi Kalimantan Selatan sebesar 42,3 % dan prevalensi pencabutan gigi atau bedah gigi di Kota Banjarmasin sebesar 49,6 % (Dinkes Provinsi Kalsel, 2007). Proses penyembuhan tulang dapat dipercepat dengan memberikan bonegraft dan suatu ekstrak herbal. Kekurangan yang dimiliki bonegraft sebagai bahan mempercepat penyembuhan tulang adalah harga yang cukup mahal dan sulitnya untuk mendapatkan bahan bonegraft tersebut, sehingga perlu dicari alternatif lain

yang dapat mempercepat penyembuhan tulang. Salah satu ekstrak herbal yang dapat berperan untuk mempercepat penyembuhan tulang adalah ekstrak kulit batang kasturi (*Mangifera casturi*). Kulit batang kasturi ini memiliki kandungan senyawa fitokimia seperti terpenoid, steroid, tanin dan flavonoid. Berdasarkan penelitian sukmana *et al*/ 2017 menyatakan bahwa dari konsentrasi 6,35%, 12,7%, dan 25,6% ekstrak kulit batang *Mangifera* kasturi pada mencit yang dilakukan pencabutan gigi menunjukkan bahwa nilai BMP-2 paling tinggi pada ekstrak dengan konsentrasi 12,7%. Pada penelitian ini juga menyatakan bahwa dari konsentrasi 6,35%, 12,7%, dan 25,6% ekstrak kulit batang *Mangifera* kasturi pada mencit yang dilakukan pencabutan gigi menunjukkan bahwa nilai IL-1 yang berpengaruh hanya pada konsentrasi 12,7%. Berdasarkan bukti penelitian tersebut maka pada penelitian ini menggunakan ekstrak kulit batang *Mangifera* kasturi dengan konsentrasi 12,7%. Berdasarkan penelitian sebelumnya menyatakan bahwa senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak kulit batang kasturi 12,7 % dapat meningkatkan regenerasi tulang (Fakhrudin, 2013; Sutomo, 2014; Sinder, et.al. 2015; Sathyendra, et.al. 2013; Sukmana et.al. 2017). Pada penelitian ini menggunakan tulang femur tikus. Tulang memiliki dua komponen yaitu tulang kortikal yang padat dan tulang trabekula atau spongiosa yang berbentuk trabekula yang menyelingi kompartemen sumsum tulang. Pada Tulang femur tikus dan femur manusia memiliki persamaan dalam yaitu sama-sama memiliki tulang kortikal yang lebih banyak

dibandingkan tulang spongiosa, sehingga pada penelitian ini menggunakan tulang femur tikus sebagai objek penelitian (Jerome, 2012)

Berdasarkan uraian latar belakang di atas maka dilakukanlah penelitian untuk mengetahui potensi ekstrak kulit batang *Mangifera casturi* 12,7 % terhadap kadar mediator penyembuhan tulang yaitu HMGB-1, BMP- 6, VEGF dan osteokalsin selama regenerasi tulang.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat peningkatan kadar HMGB-1, VEGF, BMP-6, dan osteokalsin selama regenerasi tulang setelah diberikan ekstrak kulit batang *Mangifera casturi* 12,7 %?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk membuktikan terdapat peningkatan kadar HMGB-1, VEGF, BMP-6, dan osteokalsin selama regenerasi tulang setelah diberikan ekstrak kulit batang *Mangifera casturi* 12,7 %.

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus untuk penelitian ini adalah:

- a. Untuk membuktikan terdapat peningkatan kadar HMGB-1 akibat induksi kulit batang *Mangifera casturi* 12,7 % selama regenerasi tulang setelah pencabutan gigi.

- b. Untuk membuktikan terdapat peningkatan kadar BMP-6 akibat induksi kulit batang *Mangifera casturi* 12,7 % selama regenerasi tulang setelah pencabutan gigi.
- c. Untuk membuktikan terdapat peningkatan kadar VEGF akibat induksi kulit batang *Mangifera casturi* 12,7 % selama regenerasi tulang setelah pencabutan gigi.
- d. Untuk membuktikan terdapat peningkatan kadar osteokalsin akibat induksi kulit batang *Mangifera casturi* 12,7 % selama regenerasi tulang setelah pencabutan gigi.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Teori

Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi ilmiah mengenai ekstrak kulit batang *Mangifera casturi* 12,7 % berpotensi terhadap kadar HMGB-1, BMP-6, VEGF dan osteokalsin selama regenerasi tulang setelah pencabutan gigi.

1.4.2 Praktis

Hasil penelitian ini juga dapat menjadi landasan untuk pengembangan penggunaan ekstrak kulit batang *Mangifera casturi* 12,7 % sebagai alternatif meningkatkan regenerasi tulang sehingga mempercepat penyembuhan luka akibat komplikasi setelah pencabutan gigi melalui penelitian lebih lanjut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tulang Alveolar

2.1.1. Definisi

Prosesus alveolar merupakan sebagai bagian dari rahang atas dan mandibula yang membentuk dan mendukung soket gigi. Fungsi tulang alveolar adalah rumah akar gigi, membantu untuk memposisikan gigi untuk oklusi yang lebih baik, membantu menyerap dan mendistribusikan kekuatan oklusal yang dihasilkan selama kontak gigi, sebagai penyangga ligamen periodontal, melindungi perkembangan gigi permanen, tempat erupsi gigi primer dan permanen (Fragiskos, 2013). Adapun mengenai perbedaan tulang alveolar dan femur, berdasarkan analisis histomorfometrik diketahui bahwa tulang alveolar terbentuk dari tulang kompak dengan trabekula (jaringan otot) yang lebar, sedangkan tulang femur terdiri dari tulang longgar dengan trabekula yang lebih halus (Zhou, et.al. 2018).

2.2. Formasi Tulang

Terdapat tiga langkah dasar pembentukan tulang yaitu sintesis matriks organik ekstraseluler, mineralisasi matriks yang menuju formasi tulang dan regenerasi tulang melalui proses resorpsi dan reformasi (Kini & Nandeesh, 2012).

2.2.1. Matriks Tulang

Menurut Kini & Nandeesh (2012), struktur tulang didasari oleh dua komponen, yaitu komponen anorganik (69%), yang terdiri dari hidroksiapatit (99%) dan organik (22%), dibentuk oleh kolagen (90%) dan protein struktural nonkolagen yang termasuk proteoglikan, sialoproteins, glacontaining protein, dan 2HS-glikoprotein. Komponen fungsional dari tulang meliputi faktor pertumbuhan dan sitokin. Kekerasan dan kekakuan tulang adalah karena adanya mineral garam dalam matriks osteoid, yang merupakan kristal yang kompleks kalsium dan fosfat (hidroksiapatit) (Kini & Nandeesh, 2012).

Tulang terklasifikasi mengandung sekitar 25% organik matriks, 5% air, dan 70% mineral anorganik (hidroksiapatit). Kolagen 1 merupakan 90- 95% dari matriks organik tulang. Osteoblas mensintesis dan merupakan prekursor kolagen. Mereka juga memproduksi osteokalsin, yang merupakan non-kolagen paling melimpah protein dari matriks tulang, dan proteoglikan substansi tanah. Kolagen 1 dibentuk oleh osteoblas disimpan secara paralel atau lapisan konsentris untuk menghasilkan dewasa (pipih) tulang. Ketika tulang dengan cepat terbentuk, seperti dalam janin atau kondisi patologis tertentu (misalnya, fraktur kalus, fibrous displasia, hiperparatiroidisme), kolagen tidak disimpan secara paralel tetapi dalam tenunan seperti keranjang yang mengakibatkan anyaman tulang dewasa atau primitif (Kini & Nandeesh, 2012).

Osteoblas juga mensintesis dan mensekresi protein non-kolagen, seperti proteoglikan, glikosilasi protein, protein glikosilasi dengan kegiatan sel-lampiran potensial, dan *γ-carboxylated* (GLA) protein. Protein glikosilasi utama hadir dalam tulang alkali fosfatase, yang berperan pada tulang yang belum dimineralisasi (Kini & Nandeesh, 2012).

2.2.2. Proses Penyembuhan Tulang

Proses penyembuhan tulang teridentifikasi terdiri dari tiga fase antara lain fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase remodeling (Oryan, et.al. 2015).

2.2.2.1. Fase Inflamasi

Penyembuhan luka pada tulang memiliki karakteristik yang berkelanjutan dan saling terhubung yang meliputi beberapa fase yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase remodelling. Respon inflamasi akut memuncak dalam 24 jam pertama dan selesai setelah 7 hari. Fase pertama dari fase inflamasi penyembuhan tulang adalah terbentuknya hematoma dari sel-sel darah perifer dan intramedulla, serta sel-sel sumsum tulang. Respons tersebut menyebabkan hematoma menggumpal di antara dan di sekitar ujung fraktur, dan di dalam medula membentuk templat untuk pembentukan kalus. Fase inflamasi merupakan hal penting sebagai faktor utama terjadinya hemostasis dan memerlukan sistem *innate imun* (imun alami), neutrofil dan monosit sebagai pertahanan utama tubuh terhadap patogen dan membantu dalam fagositosis jaringan yang rusak. Apabila

terjadi kerusakan jaringan maka akan ada sinyal yang disebut “*danger signals*” yang ditandai dengan dua kategori yaitu DAMPs (*Damage- Associate Molecular Patterns*) dan PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (Sinder, et.al. 2015; Sathyendra, et.al. 2013).

Magna M dan Pisetsky SD (2014) menulis bahwa DAMPs (*Damage- Associate Molecular Patterns*) merupakan “*alarm danger*” yang bersifat intrinsik dan PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) sebagai faktor ekstrinsik yang terhubung dengan interaksi terhadap kerusakan jaringan dan merupakan bagian dari mediator inflamasi HMGB-1 (*High Mobility Group Box 1*). Aktivasi DAMPs membuat HMGB-1 berikatan dengan RAGE dan juga TLR2/TLR4 melalui jalur MyD88 yang menginduksi transkripsi jalur NF- κ B. Aktivasi jalur NF- κ B dapat meningkatkan aktivasi sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF α . Aktivasi beberapa sitokin proinflamasi tersebut dapat meningkatkan aktivitas BMP-6 dan VEGF yang merupakan biomarker yang berperan pada proses tahap proliferasi (Yang, et.al. 2008; Aoyagi, et.al. 2018).

2.2.2.2 Fase Proliferasi

Fase proliferasi terjadi setelah proses inflamasi sampai minggu ke-3. Pada fase proliferasi dimulai dengan proses resorpsi tulang nekrosis di daerah tulang yang rusak dengan menggunakan osteoklas. Kemudian dilanjutkan dengan proses pembentukan kalus, perbaikan vaskular dan sekresi osteoid. Pada fase ini melibatkan penggantian kalus lunak secara bertahap oleh tulang dengan anyaman yang belum matang. Jaringan

masenkim akan berdeferensiasi menjadi kondrosit pada daerah kallus lunak dan menstabilkan zona fraktur. Beberapa biomarker yang berperan dalam proses proliferasi diantaranya adalah BMP-6 dan VEGF (Oryan et.al. 2015).

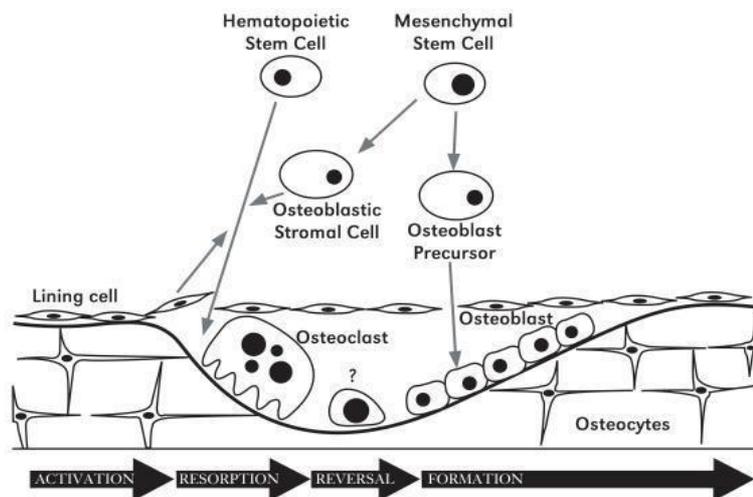
VEGF berperan sebagai salah satu faktor penting yang berperan untuk perbaikan pembuluh darah yang rusak atau angiogenesis. Hasil riset menunjukkan VEGF sebagai kunci regulator angiogenesis karena merangsang pembentukan proliferasi sel endotel, menstimulasi angiogenesis, vasodilatasi dan meningkatkan permeabilitas vaskular. Pembentukan vaskular pada fase penyembuhan tulang merupakan faktor kunci fase pertama pada fraktur dan regenerasi tulang. Hal senada juga disebutkan oleh Yang, et.al. 2012 bahwa osteogenesis dan angiogenesis adalah dua hal yang sangat dekat korelasinya selama proses pertumbuhan, perkembangan, remodelling dan perbaikan tulang. Pada proses proliferasi BMP-6 memiliki peran dalam menginduksi pembentukan tulang pada daerah kallus lunak. BMP-6 juga memainkan peran penting dalam mempertahankan massa tulang dan menginduksi diferensiasi *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) menjadi osteoblas, meningkatkan jumlah osteoblas dewasa dan meningkatkan kemampuan diferensiasi osteoblas (Kini & Nandeesh, 2012; Yang, et.al. 2012; Cule et.al.2018).

2.2.2.3. Fase Regenerasi/Remodeling

Tulang keras mengalami remodel menjadi tulang lamelar. Osteoklas berpartisipasi pada regenerasi dengan meresorpsi tulang, faktor

seperti BMP-a glikoprotein yang resisten kolagen) menghasilkan proses regenerasi secara lebih lanjut. Berperan sebagai faktor pertumbuhan dan mitogen, BMP menginduksi diferensiasi sel mesenkim ke pembentukan tulang (Fragiskos, 2013; Miloro, et.al. 2016).

Berikut gambar proses regenerasi tulang:



Gambar 2.2.2.3. Fase Regenerasi Tulang (Rockville, 2004)

Fase regenerasi/remodeling merupakan fase terakhir dan terlama dari penyembuhan tulang. Fase ini merupakan suatu proses yang kompleks yang melibatkan resorpsi tulang yang diikuti dengan pembentukan tulang baru. Adapun urutan fase *regenerasi* tulang yaitu aktivasi, resorpsi (penyerapan), pembalikan (*reverse*), dan pembentukan seperti gambar di atas. Langkah aktivasi tergantung pada sel-sel turunan osteoblas, baik pada permukaan tulang atau di sumsum, yang bekerja pada prekursor sel darah (sel hematopoietik) untuk membentuk sel penyerap tulang atau osteoklas. Proses resorpsi dapat terjadi di bawah lapisan sel. Setelah fase pembalikan, osteoblas mulai menghasilkan tulang baru. Beberapa

osteoblas tetap di dalam tulang dan diubah menjadi osteosit, yang terhubung satu sama lain ke permukaan osteoblas. Adapun ketiga fase yaitu aktivasi, resorpsi (penyerapan), pembalikan relatif cepat, mungkin hanya berlangsung 3 minggu pada manusia. Fase akhir pembentukan tulang membutuhkan waktu lebih lama, hingga 3 atau 4 bulan. Pada fase ini BMP-6 berperan dalam melakukan kendali pada reaksi kompleks antara sel osteoklas dan osteoblas dalam melakukan tahap remodeling (Rockville, 2004).

Siklus remodeling tulang dimulai ketika sel-sel prekursor osteoklas menerima sinyal dari osteoblas untuk berdiferensiasi menjadi osteoklas. Osteoklas yang matur kemudian mensintesis enzim proteolitik yang mencerna matriks kolagen. Resorpsi tulang ini merupakan tahapan awal siklus remodeling yang diatur oleh apoptosis osteoklas. Fase selanjutnya dari siklus remodeling preosteoblas ditarik dari *mesenchymal stem cell* dalam sumsum tulang. Osteoblas matur mensintesis protein tulang, terutama osteokalsin dan mengatur mineralisasi tulang dan menjadi osteosit. Sehingga osteokalsin berperan sebagai sebagai marker aktif osteoblas pada fase proliferasi (Seibel, 2005).

2.3. Tumbuhan Kasturi

Gambar 2.3. Batang *Mangifera casturi* Kosterm (Sari *et.al.*, 2014)



Kasturi (*Mangifera casturi kosterm*) merupakan suatu jenis tanaman yang termasuk dalam genus mangifera, tanaman ini merupakan endemik yang tumbuh khas di daerah Kalimantan Selatan. Masyarakat Kalimantan Selatan memanfaatkan buahnya untuk dimakan, buah kasturi memiliki rasa yang manis dan aroma yang khas. Daun, batang, akar dan daun kasturi memiliki senyawa aktif sehingga berpotensi menjadi obat, berdasarkan uji fitokimia batang daun kasturi mengandung senyawa tannin dan saponin, (Santi, *et.al.* 2016; Sutomo, *et.al.* 2019)

Tumbuhan *Mangifera casturi* memiliki perakaran tunggang yang berwarna coklat keabu-abuan. Batang berbentuk silindris, batang utama memiliki ketinggian mencapai 25 m, diameter batang mencapai 1 m. Permukaan batang kasar, lembab dan bergetah, lapisan luar kulit batang berwarna coklat tua dengan retakan keabu-abuan dari kulit yang telah mati, lapisan dalam berwarna coklat muda. Daun berwarna hijau muda sampai hijau tua dengan ukuran panjang $\pm 20 -27$ cm dan lebar $\pm 5,5 -8,5$ cm. Tulang daun menyirip dengan jumlah 17-23 pasang. Daun berbentuk lancet dengan ujung runcing, tepi daun rata, dan permukaan daun kasar. Buah

berwarna coklat keunguan dengan dengan bintik-bintik bulat kecil kehijauan saat matang. Permukaan kulit licin dan bergetah. Buah memiliki panjang \pm 6-8 cm dan diameter \pm 4-5 cm. Daging buah tipis dan berair, berwarna kuning terang hingga jingga, memiliki rasa yang manis dan banyak mengandung serabut. Pada pemeriksaan anatomi kulit batang *M. casturi* terdapat sel epidermis, korteks, trikoma, sklerenkim, berkas pembuluh dan jari-jari empulur. Pada epidermis kulit batang terdapat kutikula yang rapat, sklerenkim berbentuk kubus dengan dinding sel yang tebal. Jari-jari empulur berbentuk balok, pada penampang membujur juga terdapat trikoma berupa rambut-rambut halus pada permukaan tumbuhan (Sutomo *et.al.*, 2017).

Mangifera merupakan genus yang memiliki anggota spesies cukup besar.

Kedudukan Mangifera dalam taksonomi adalah sebagai berikut:

Kingdom	:	Plantae
Divisio	:	Spermatophyta
Subdivisi	:	Angiospermae
Kelas	:	Dicotyledoneae
Ordo	:	Sapindales
Familia	:	Anacardiaceae
Genus	:	Mangifera
Spesies	:	<i>Mangifera casturi</i> (kosterm.)

2.3.1. Uji Fitokimia Ekstrak kulit batang *Mangifera casturi*

Berdasarkan hasil uji fitokimia menyatakan bahwa dalam kulit batang *Mangifera casturi* memiliki beberapa kandungan metabolit sekunder yaitu tannin, saponin, fenol, flavonoid, terpenoid. Berdasarkan penelitian Ramadhan *et.al.*, tahun 2021, disebutkan bahwa kandungan flavonoid pada ekstrak kulit batang *Mangifera casturi* adalah sebesar 5,14 mg dan kandungan fenol pada ekstrak kulit batang *Mangifera casturi* adalah sebesar 3,92 mg (Sutomo *et.al.*, 2017; Ramadhan *et.al.*, 2021).

Saponin merupakan glikosida yang memiliki aglikon berupa steroid dan triterpenoid. Saponin memiliki berbagai kelompok glikosil yang terikat pada posisi C3, tetapi beberapa saponin memiliki dua rantai gula yang menempel pada posisi C3 dan. Struktur saponin tersebut menyebabkan saponin bersifat seperti sabun atau deterjen sehingga saponin disebut sebagai surfaktan alami. Saponin steroid tersusun atas inti steroid (C27) dengan molekul karbohidrat dan jika terhidrolisis menghasilkan suatu aglikon yang dikenal saraponin. Saponin steroid terutama terdapat pada tanaman monokotil seperti kelompok sansevieria (*agavaceae*), gadung (*dioscoreaceae*) dan tanaman berbunga (*liliacea*). Saponin triterpenoid tersusun atas inti triterpenoid dengan senyawa karbohidrat yang dihidrolisis menghasilkan aglikon yang dikenal sapogenin. Saponin triterpenoid banyak terdapat pada tanaman dikotil seperti kacang-kacangan (*leguminosae*), kelompok pinang (*araliaceae*), dan *caryophyllaceae*. Beberapa hasil penelitian telah menunjukkan tentang peran saponin triperpenoid dan

beberapa anggota saponin triterpenoid juga telah diketahui memiliki sifat farmakologis yang menguntungkan. Lebih dari 11 macam saponin telah teridentifikasi seperti dammaranes, tirucallanes, lupanes, hopanes, oleananes, taraxasteranes, ursanes, cycloartanes, lanostanes, cucurbitanes dan steroid. Saponin memiliki berbagai macam sifat biologis seperti kemampuan hemolitik, aktivitas antibakterial, antimolluska, aktivitas antivirus, aktivitas sitotoksik atau anti kanker, efek hipokolesterolemia, dan antiprotozoa (Jadhava *dk*, 2016; Yanuartono, et.al. 2017).

Tanin adalah senyawa polifenol yang memiliki berat molekul cukup tinggi (lebih dari 1000 sma) dan dapat membentuk kompleks dengan protein. Senyawa ini terdapat pada kulit kayu dan kayu. Tanin berwarna putih kekuning-kuningan sampai coklat terang, berbentuk serbuk atau berlapis-lapis seperti kulit terang, berbau khas dan rasa sepat. (Malangngia *et.al.*, 2012; Kiay *et.al.*, 2011). Berdasarkan strukturnya, tanin dibedakan menjadi dua kelas yaitu tanin terkondensasi (*condensed tannins*) dan tanin terhidrolisis (*hydrolysable tannins*) (Malangngia et.al., 2012; Kiay et.al., 2011).

Tanin terkondensasi biasanya tidak dapat dihidrolisis, melainkan terkondensasi dan menghasilkan asam klorida, terdiri dari oligomer dari dua atau lebih seperti katekin, epikatekin, dan galokatekin. Tanin terhidrolisis biasanya berikatan dengan karbohidrat yang dapat membentuk jembatan oksigen, sehingga dapat dihidrolisis dengan menggunakan asam sulfat atau asam klorida yang terdiri dari inti pusat karbohidrat dan asam

karboksilat fenolik terikat oleh hubungan ester. Tanin terhidrolisis terbagi menjadi gallotanin dan ellagitanin. Galotanin pada hidrolisis menghasilkan gula dan asam galat, sedangkan hidrolisis ellagitanin menghasilkan gula, asam galat dan asam elagat. Tanin memiliki afinitas sangat tinggi untuk protein (Malangngia, et.al., 2012; Kiay, et.al. 2011).

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆. Adapun kerangkanya terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam sub kelompoknya. Sistem penomorannya digunakan untuk membedakan posisi karbon di sekitar molekulnya (Cook dan S. Samman, 1996, Rajalakshmi dan S. Narasimhan, 1985, White dan Y. Xing, 1951; Madhavi et al, 1985; Maslarova, 2001).

Berbagai jenis senyawa, kandungan dan aktivitas antioksidatif flavonoid sebagai salah satu kelompok antioksidan alami terdapat pada sereal, sayuran dan buah. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon (Cuppett, et.al.1954).

Terpenoid adalah senyawa metabolit sekunder yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isoprena dan diturunkan dari hidrokarbon C 30 asiklik, yaitu skualena. Senyawa ini berbentuk siklik atau asiklik dan sering memiliki gugus alkohol, aldehida, atau asam karboksilat. Terpenoid merupakan senyawa hidrokarbon isometrik yang berperan membantu proses sintesis organik dan pemulihan sel tubuh. Beberapa jenis terpenoid pada jaringan yang mengalami luka dapat bersifat toksik bagi mikroorganisme penyebab infeksi dan membantu menutup luka. Beberapa senyawa metabolit sekunder yang dimiliki oleh kasturi tersebut memiliki peran dalam perbaikan tulang (Nasruddin, 2015; Kuncoro 2017).

2.3.2. Stabilitas *Mangifera casturi*

Mangifera casturi merupakan tanaman yang tumbuh didaerah tropis dan subtropis. Menurut penelitian fakhrozi *et.al.*, tahun 2013, tanaman ini tumbuh dengan baik didaerah rawa gambut, oleh karena hal tersebut *Mangifera casturi* tumbuh baik di daerah Kalimantan Selatan. Berdasarkan penelitiannya juga menunjukkan bahwa *Mangifera casturi* dapat tumbuh di daerah dengan ph 3,5-6 (Fakhrozi, et.al. 2013).

2.3.3. Anatomi dan Pengujian kulit batang *Magifera casturi*

Pada pemeriksaan anatomi kulit batang *Mangifera casturi* terdapat sel epidermis, korteks, trikoma, sklerenkim, berkas pembuluh dan jari-jari empulur. Pada epidermis kulit batang terdapat kutikula yang rapat, sklerenkim berbentuk kubus dengan dinding sel yang tebal, dan jari-jari batang empulur yang berbentuk balok. Pada penampang membujur akar

tanaman juga terdapat trikoma yang berupa rambut-rambut halus pada permukaan tumbuhan dari sel epidermis tanaman (Sutomo, et.al. 2017). Berikut gambar anatomi tanama kasturi:



Hasil pemeriksaan anatomi sel kulit batang *Mangifera casturi*:

(a) penampang melintang, (b) penampang membujur (pembesaran 40x)

Dari hasil analisis ekstrak didapatkan nilai kadar air 12,5%, kadar abu total 1,0% dan kadar abu tidak larut asam 0,67%. Penentuan kadar air dikaitkan dengan kemurnian ekstrak, di mana semakin sedikit kadar air pada ekstrak maka semakin sedikit kemungkinan ekstrak terkontaminasi oleh pertumbuhan jamur. Penentuan kadar abu bertujuan untuk mengukur jumlah komponen anorganik atau mineral yang tersisa setelah proses pengabuan. Kadar seyawa anorganik atau mineral dalam jumlah tertentu dapat mempengaruhi sifat fisik bahan. Abu yang tidak larut asam menunjukkan keberadaan pengotor seperti pasir atau silikat yang berasal dari tanah. Hasil penentuan kadar abu total dan abu tidak larut asam ekstrak metanol kulit batang *Mangifera casturi* telah memenuhi persyaratan farmakope herbal Indonesia (Sutomo, et.al. 2017).

Dari hasil pemeriksaan didapatkan kadar total bakteri <1,10 koloni/mg dan kadar kapang 250. Uji total bakteri dan total kapang dilakukan untuk mengetahui jumlah mikroba yang dapat mengkontaminas ekstrak.

Keberadaan cemaran mikroba dapat mempengaruhi stabilitas ekstrak dan dapat membahayakan kesehatan. Terdapat pertumbuhan kapang pada ekstrak dapat disebabkan oleh adanya kandungan air dalam ekstrak (Sutomo, et.al. 2017). Pada hasil pemeriksaan juga menunjukkan bahwa kadar logam Pb dalam ekstrak adalah sebesar 3 mg/kg. Penentuan kadar logam pada ekstrak berguna menjamin bahwa ekstrak tidak mengandung logam melebihi batas yang ditetapkan karena bersifat toksik terhadap kesehatan. Hasil penelitian menunjukkan kadar Pb telah memenuhi persyaratan BPOM (Sutomo, et.al. 2017).

Adapun pengujian farmakokinetik untuk ekstrak kulit batang *Mangifera casturi* dapat dilakukan melalui penelitian in-vivo menggunakan hewan coba dan penelitian klinis dengan subjek manusia. Farmakokinetik adalah bidang ilmu yang mempelajari mengenai absorpsi (penyerapan obat dari tempat masuk obat ke jaringan sistemik dalam tubuh), distribusi (peredaran obat dalam tubuh), metabolisme (biotransformasi obat dalam tubuh), dan ekskresi (pengeluaran obat dalam tubuh). Salah satu studi telah melakukan uji farmakokinetik dari *mangiferin* (*Mangifera indica*) dari sampel darah manusia. Parameter yang diukur di antaranya konsentrasi obat dalam tubuh, konsentrasi maksimum (C_{max}), ketersediaan hayati obat dalam tubuh (AUC), dan waktu paruh obat. Pengukuran dilakukan dengan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). dan didapatkan hasil bahwa konsentrasi *mangiferin* dalam plasma mencapai $38,64 \pm 6,75$ ng/mL sekitar 1 jam setelah pemberian oral dan waktu paruh obat adalah 7,85

± 1,72 jam. Absorpsi *mangiferin* meningkat dengan pemberian dosis yang lebih besar (Hou et al. 2012).

2.4. Metabolit Sekunder dalam Kasturi

Kandungan senyawa metabolit sekunder yang dominan dalam kulit batang kasturi adalah adalah saponin, terpenoid, flavonoid, steroid dan tanin. Adapun persentasi tanin dalam 8,5% rendemen ekstrak batang tersebut mencapai 127,43 gram. Penelitian lain menyebutkan bahwa ekstrak metanol kulit batang *Mangifera casturi* mengandung flavonoid, alkaloid, fenol dan steroid. Selain itu, didapatkan pula senyawa metabolit sekunder pada akar dan batang Kasturi (*Mangifera casturi*) adalah saponin dan tanin. (Sari, et.al. 2014; Sukmana, et.al. 2017; Sutomo 2017; Mustikasari, 2008). Berdasarkan penjelasan sebelumnya, senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak *Mangifera casturi* seperti flavonoid, tannin, saponin, terpenoid, dan steroid dapat meningkatkan kadar HMGB-1, VEGF, BMP-6 dan osteokalsin selama proses perbaikan tulang setelah ekstrak gigi (Fakhrudin, 2013; Sutomo, 2014).

2.5. Bonegraft

Bonegraft merupakan suatu bagian jaringan yang diambil dari satu tempat dan ditransplantasikan ke tempat yang lain, baik pada individu yang sama maupun individu yang berlainan. Tujuannya adalah untuk memperbaiki suatu cacat yang disebabkan oleh penyakit, kecelakaan atau

anomali pertumbuhan dan perkembangan. Bonegraft merupakan bahan yang diimplantasikan sehingga mempromosikan penyembuhan tulang, baik sendiri atau dalam kombinasi dengan bahan lain. Penyembuhan tulang di lokasi resipien terjadi melalui satu atau lebih dari mekanisme berikut: osteokonduksi, osteoinduksi dan osteogenesis (Elsalanty, et.al., 2009).

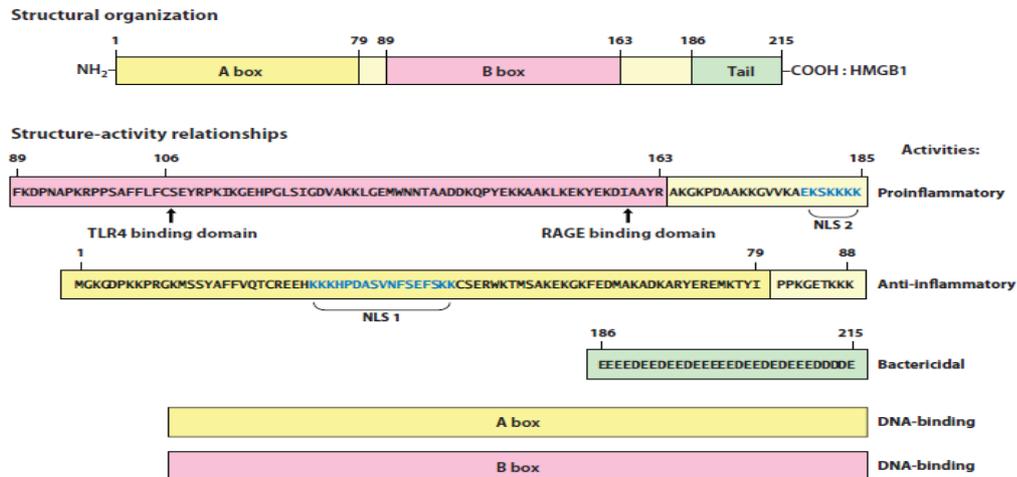
Penggunaan bahan augmentasi bonegraft dibagi menjadi natural transplan (*autograf*, *allograf* dan *senograf*) dan bahan sintetik (*alloplas*). Penggunaan bahan graf secara aplikasi klinis tersebut berdasarkan pada hipotesis sifat osteogenik, osteoinduktif, osteokonduktif atau kombinasi (Sheikh et al, 2015). Aplikasi ini hanya dapat diterima oleh sel dengan bentuk tiga dimensi (3D) dan porositas tulang, sebagai jalan masuk morfogenik, sitokin, faktor tumbuh, nutrisi dan oksigen (Wang et al, 2013; Wang et al, 2014). Adapun prosedur bonegraft merupakan suatu prosedur dengan kepekaan teknis yang besar dan memperhatikan segala aspek pembedahan yang bisa dikontrol (Pedersen, 1996).

2.6. HMGB-1

HMGB-1 (*High Mobility Group Box-1*) dideskripsikan sebagai protein nuklir pengikat DNA, dan fungsi utamanya adalah sebagai kofaktor nukleus dalam regulasi transkripsi. Sebagai kofaktor nukleus, HMGB-1 diketahui memiliki peran sebagai molekul pengantar pesan intraseluler dilesetelahn dari sel tertentu ke ekstraseluler untuk berefek pada reseptor sel tertentu. Peran lain dari HMGB-1 adalah sitokin pro-inflamasi yang berkontribusi

penting dalam banyak kasus inflamasi steril, infeksi termasuk sepsis. Ikatan HMGB-1 dengan reseptor permukaan sel imun, akan mengaktifkan respon intraseluler untuk mengatur fungsi imunitas sel termasuk kemotaksis dan modulasi sistem imun (Yang H et.al. 2012).

HMGB-1 adalah anggota pertama dari keluarga *high mobility group box* (HMGB). Keluarga HMGB terdiri dari HMGB 1, 2, dan 3. HMGB-4 sudah diidentifikasi sebagai anggota baru dari keluarga HMGB, namun identik dengan HMGB-3 sehingga selanjutnya dinamai sebagai HMGB-3. Struktur semua protein keluarga HMGB sangat identik (>80 % mirip). Kadar HMGB- 1 terdapat di hampir semua jenis sel mamalia yang diperiksa, kadar HMGB- 2 terbatas pada jaringan limfoid dan testis di hewan dewasa, sedangkan HMGB-3 kadarnya terbatas pada embrio dan sel punca hematopoetik. Di antara ketiga jenis protein HMGB, HMGB-1 adalah protein inti non histon yang paling berlimpah, dan pada beberapa tingkatan tertentu terdapat juga di sitoplasma, seakan-akan terangkut kembali dan keluar dari inti (Yang H et.al. 2012).



Gambar 2.6 Struktur kimia High Mobility Group Box-1 (HMGB-1)

HMGB-1 adalah suatu protein dengan berat molekul 25 kDa dari 215 asam amino. Protein tersebut terbagi menjadi tiga bagian, dua bagian ikatan DNA bermuatan positif yang disebut kotak A dan B, serta satu bagian yang bersifat asam bermuatan negatif yang dibentuk oleh 30 asam glutamat dan aspartat dan sekitar 20% sisanya adalah lisin. Struktur kotak A dan B adalah heliks dan sebagian ditutupi bagian yang terlipat di atas protein. Ada dua sinyal pembawa nukleus di bagian proksimal kotak A dan kotak B dan dapat berikatan dengan nukleus CRM1. Pada kotak A dan B, diperlihatkan bahwa aktivitas sitokin ekstraseluler terdapat di kotak B, dan aktivitas ini dapat dihambat oleh protein kotak A. Rangkaian primer HMGB-1 sangat identik pada semua mamalia, lebih dari 98,5% mirip antara manusia dan tikus. HMGB-1 memiliki 3 sistein protein, 2 berada di posisi 23 dan 45 kotak A di posisi 106 kotak B. Posisi sistein 106 di kotak B perannya sangat diperlukan sitokin, oksidasi atau mutasi selektif residu yang akan menghapus aktivitas sinyal HMGB-1 untuk pelepasan sitokin. HMGB-1 juga

mengandung dua NLS (*nuclear localization signal*), satu terletak di protein kotak A aa 28-44 dan yang lain terletak di kotak B aa 179-1850 (Anderson U *et.al.*, 2011).

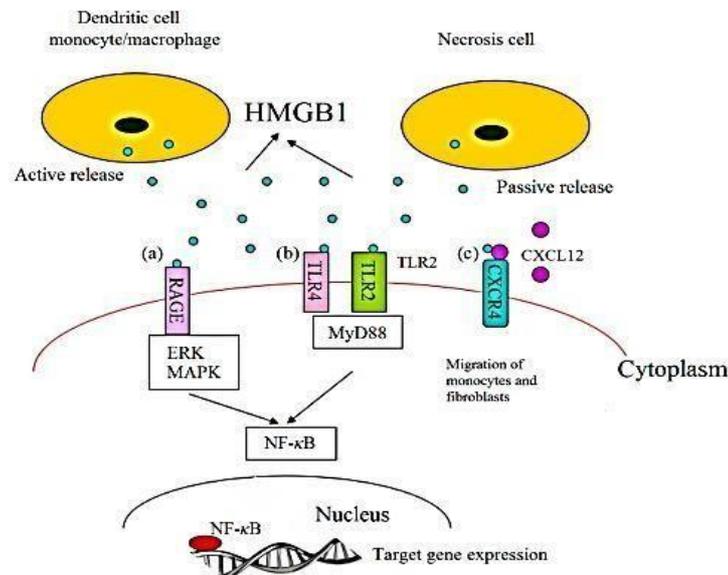
Empat residu lisin berada di *nuclear localization signal* (NLS1), dan lima lainnya berada di NLS2. HMGB-1 sangat rentan pada modifikasi asetilasi, menghasilkan nukleus dan pelepasan HMGB-1. Di nukleus, HMGB-1 menunjang struktur kromatin melalui ikatan DNA dengan rangkaian yang nonspesifik dan terlibat dalam regulasi transkripsi gen. Secara intraseluler, HMGB-1 terlibat dalam autofagi dan pada dsRNA *dependent protein kinase*, terlibat dalam aktivasi inflamasi. Pada permukaan sel, protein terkadar di membran trombosit yang teraktivasi saat awal neuron, terlibat dalam pertumbuhan neurit selama perkembangan dan regenerasi sel saraf. HMGB-1 ekstraseluler telah menjadi pusat perhatian terkait perannya yang terlibat dalam berbagai respon imun, Penelitian lain mengenai fungsi struktural HMGB-1, menyebutkan bahwa aktivitas anti sitokin berperan sebagai antagonistik HMGB-1 spesifik, tetapi mekanismenya masih tetap belum dimengerti. HMGB-1 sendiri mengandung 3 residu sistein pada posisi 23, 45 dan 106, dan sensitif pada modifikasi yang bergantung pada reaksi reduksi oksidasi. Penemuan terbaru menunjukkan bahwa reaksi reduksi oksidasi dan modifikasi asetil secara langsung mengontrol sitokin dan aktifitas HMGB-1. Adapun kadar normal HMGB-1 dalam serum adalah $3,9 \pm 3,4$ ng/ml (Anderson U. *et.al.*, 2011; Chung Hye Won *et.al.*, 2009).

Tabel 2.5. Fungsi Kompartemen Spesifik *HMGB-1* (Yang H, *et.al.*.,. 2013)

<p>Nukleus</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pengikat DNA: regulasi transkripsi 2. Stabilitas kromatin 3. Replikasi sel 4. Perbaikan DNA
<p>Intraseluler</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aktivasi peradangan 2. Autofagi: C106 dibutuhkan untuk induksi autofagi 3. Sistein-sistein, ikatan disulfida dibutuhkan untuk induksi autofagi 4. Sebagai jalan pelepasan 5. Formasi vesikel
<p>Ekstraseluler</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ikatan membran memproduksi neuron/sel saraf 2. Aktivasi trombosit 3. Ekstraseluler: pro-angiogenik 4. Antibakterial 5. Penurunan seluruh sistein: inflamasi 6. Menyerupai kemokin: kemotaksis 7. Semua sistein yang teroksidasi: non-inflamasi

	8. Sistein dan ikatan disulfida: inflamasi, menyerupai sitokin, menginduksi sitokin 9. Hiperasetilasi lisin: inflamasi, induksi sitokin
--	---

2.6.1. Aktivasi HMGB-1



Gambar 2.6.1. Mekanisme Aktivasi *High Mobility Group Box-1*

Aktivasi jalur NF- κ B mengarah pada transkripsi sitokin. HMGB-1 juga berinteraksi dengan TLR2 / TLR4 melalui jalur MyD88, pengikatan HMGB- 1 dan CXCL12 mendorong migrasi monosit dan fibroblast .Aktivasi jalur NF- κ B dapat meningkatkan aktivasi sitokin proinflamasi seperti IL1,IL6 dan TNF α . Aktivasi beberapa sitokin proinflamasi tersebut dapat meningkatkan aktivitas osteoblas, sehingga peningkatan HMBGB-1 dalam proses

penyembuhan setelah ekstrak gigi dapat mempercepat proses penyembuhan luka (Aoyagi *et.al.*, 2018; Yang *et.al.*, 2008; Zhou Qin *et.al.*, 2021).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Aoyagi, *et.al.*, 2018 disebutkan bahwa HMGB-1 ditranslokasikan ke dalam sitoplasma dan ruang ekstraseluler sel epitel gingiva setelah ekstrak gigi. HMGB-1 dari sel epitel gingiva dapat mengaktifkan sel imun seperti makrofag, makrofag akan meningkatkan aktivasi VEGF-A Mrna. VEGF-A dapat mempromosikan angiogenesis pada soket ekstrak gigi. Makrofag juga dapat mengaktifasi osteoklas, dan osteoklas yang teraktivasi menginduksi remodeling tulang. Osteoklas yang teraktivasi akan melakukan degradasi tulang dan melepaskan TGF- β dan kalsium dari tulang untuk mengatur diferensiasi progenitor osteoblas menjadi osteoblas. Selain hal tersebut VEGF yang teraktivasi juga memainkan peran dalam diferensiasi osteoblas dan pembentukan tulang. Kadar HMGB-1 meningkat pada hari ke-1 dan ke- 7 dan menurun pada hari ke-28 (Aoyagi *et.al.*, 2018; Yang *et.al.*, 2012; Zhou Qin *et.al.*, 2021).

Berdasarkan penelitian Plotkin *et.al.*, 2019 disebutkan bahwa penyembuhan tulang adalah proses regeneratif tulang yang kompleks yang terdiri dari pembentukan tulang intramembran dan pembentukan tulang endokondral. Proses pertama terjadinya adalah sel punca mesenkimal (MSCs) yang diturunkan dari sumsum tulang dan langsung berdiferensiasi menjadi osteoblas untuk membentuk kalus, sedangkan yang terakhir

merupakan proses di mana sel masenkim yang berasal dari sumsum tulang berdiferensiasi menjadi kondrosit untuk membentuk kalus tulang rawan sebelum membentuk kalus osseus untuk perbaikan tulang. Berdasarkan hal tersebut sudah diketahui bahwa migrasi dan diferensiasi osteogenik dari sel masenkim memainkan peran penting dalam penyembuhan lokal dari tulang. Pada penelitian ini juga menemukan bahwa HMGB-1 dapat mempromosikan migrasi dan diferensiasi osteogenik sel masenkim dengan mengaktifkan jalur pensinyalan p38 MAPK. Selain itu, HMGB-1 rekombinan dapat mengaktifkan jalur pensinyalan NF- κ B p65 untuk menginduksi migrasi osteoblas (Plotkin *et.al.*, 2019)

2.7. VEGF (*Vascular Endotelial Growth Factor*)

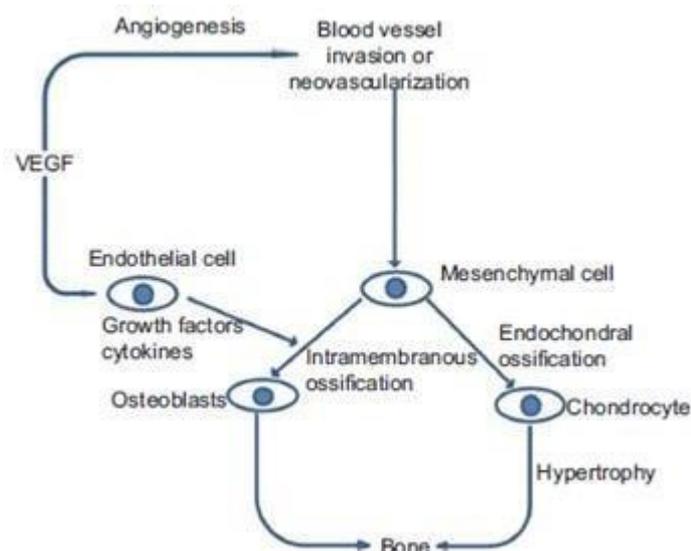
Vascular endothelial growth factor (VEGF) atau nama lainnya *vascular permeability factor* (VPF) adalah suatu protein yang menstimulasi lapisan endotel di sekitar mikrovaskular untuk berproliferasi, migrasi, dan merubah pola gen, di mana terjadi ekstrasvasi plasma protein ke ruang ekstravaskuler. VEGF memiliki keluarga protein homodimerik yang terdiri dari setidaknya 6 anggota yaitu VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E dan Placental growth factor (PlGF). VEGF-C dan -D penting untuk limfangiogenesis. VEGF-B memiliki peran dalam angiogenesis embrionik dan PlGF sangat penting komponen angiogenesis patologis. mRNA VEGF diterjemahkan ke dalam empat isoform utama dalam manusia, yaitu VEGF121, VEGF165, VEGF189 dan VEGF206.

VEGF_{121/120} berdifusi bebas dalam tubuh, sedangkan VEGF_{189/188} dan VEGF₂₀₆ berada dalam matriks ekstraseluler (ECM). VEGF_{165/164} merupakan VEGF yang berfungsi dalam penyembuhan tulang (Hu dan Olsen, 2016)

VEGF dikadarkan di endotel dan merupakan mediator yang dapat meningkatkan permeabilitas kapiler pada berbagai keadaan patologis. Aktivitas VEGF dapat meningkat dengan peningkatan sitokin proinflamasi yang diaktivasi melewati jalur NF- κ B. Beberapa sitokin proinflamasi yang dapat meningkatkan aktivitas VEGF adalah IL-1, IL-6, IL-8, TGF- β , and TNF- α . Dalam proses penyembuhan tulang peningkatan VEGF dapat membantu mempercepat penyembuhan tulang. Selain hal tersebut beberapa faktor-faktor juga dapat meningkatkan aktivitas VEGF yaitu TGF- β 1, TGF- β 2, Bone morphogenetic protein (BMP) 2 (BMP2), BMP4 dan BMP7 (Hu dan Olsen, 2016)

VEGF berperan sebagai salah satu faktor penting yang berperan untuk perbaikan pembuluh darah yang rusak atau angiogenesis. Hasil riset menunjukkan VEGF sebagai kunci regulator angiogenesis fisiologis maupun patologis, karena merangsang pembentukan proliferasi sel endotel, menstimulasi angiogenesis, vasodilatasi dan meningkatkan permeabilitas vaskular, yang merupakan faktor kunci fase pertama pada fraktur dan regenerasi tulang. Hal senada juga disebutkan oleh Yang *et.al.*, 2012 bahwa osteogenesis dan angiogenesis adalah dua hal yang sangat dekat korelasinya selama proses pertumbuhan, perkembangan,

remodelling dan repair tulang. Tidak hanya mempunyai efek angiogenesis, VEGF bekerja sebagai mediator esensial pada dua proses ossifikasi endokondrial dan ossifikasi intramembranous. Osifikasi endokondrial berperan penting pada proses pembentukan tulang seperti pertumbuhan mandibula, tulang panjang dan penyembuhan fraktur tulang. Sedangkan ossifikasi intramembranous seperti tulang rawan, jaringan avaskular pada tulang selama ossifikasi endokondrial (Kini & Nandeesh, 2012; Yang *et.al.*, 2012).



Gambar 2.7 Skema efek VEGF pada angiogenesis dan osteogenesis (Yang *et.al.*, 2012)

. Peran VEGF pada ossifikasi *intramembranous* menunjukkan adanya perbaikan tulang secara langsung pada model tikus, yang tampak menonjol pada hari ke-7 dibandingkan hari ke-14. (Yang *et.al.*, 2012). Menurut Sandor *et.al.* (2012) VEGF mulai tampak meningkat pada 48 jam pertama sampai dengan 7 hari vaskularisasi dan *bone healing* pada fraktur

tulang dan *bone defect*. Secara singkat dapat dijelaskan VEGF berperan penting terhadap peningkatan osteogenesis dengan menginduksi neovaskularisasi dan efek secara langsung pada sel tulang melalui regulasi gen alkalinfosfatase (ALP), osteopontin (OPN), osteokalsin dan OPG/RANKL (Sandor *et.al.*, 2012 ; Yang *et.al.*, 2014)

Dalam penyembuhan luka tulang terdapat kadar dan fungsi VEGF pada fase inflamasi. Setelah cedera tulang karena keadaan hipoksia pada hematoma menyebabkan induksi VEGF, dan matriks fibrin pada hematoma dapat berfungsi sebagai reservoir VEGF. Setelah cedera, jumlah neutrofil dalam sirkulasi perifer meningkat dan neutrofil yang bersirkulasi direkrut ke dalam hematoma untuk melakukan fagositosis debris tulang dan mikroba patogen. VEGF juga menginduksi kemotaksis dari neutrophil dan meningkatkan permeabilitas sinusoid di sumsum tulang. Setelah terjadi fagositosis oleh netrofil terjadi infiltrasi makrofag dan sel inflamasi lainnya ke lokasi cedera. Makrofag menghasilkan beberapa sitokin, seperti TNF- α , IL-1 α , dan IL-1 β , yang mengaktifkan sel endotel untuk mempromosikan revaskularisasi di lokasi cedera. Selain itu, sitokin tersebut juga menginduksi VEGF. Pada fase akhir inflamasi makrofag berperan dalam memfagositosis neutrofil yang menua. Penyerapan neutrofil oleh makrofag menyebabkan peralihan fenotip makrofag dari M1 ke M2. Ini menandakan makrofag untuk melesetelahn mediator, seperti TGF- β 1, yang dapat menekan respon inflamasi dan memulai proses perbaikan tulang. (Hu dan Olsen, 2016)

Dalam pembentukan tulang endokondral VEGF bisa mengatur diferensiasi sel progenitor skeletal dari sumsum tulang, periosteum dan otot sekitarnya menjadi kondrosit atau osteoblas. Dalam pembentukan tulang endokondral, kondrosit dalam kerangka tulang rawan berhenti berkembang biak dan matang menjadi kondrosit hipertrofik. Kondrosit hipertrofik mengkadarkan osterix (osx), yang menginduksi kadar VEGF. VEGF ini merangsang pembentukan pembuluh darah dan perekrutan kondroklas ke dalam kartilago hipertrofik, dan memfasilitasi penggantian template tulang rawan dengan kalus tulang. Selain itu, prekursor osteoblas juga mengkadarkan Osx yang menghasilkan VEGF dalam jumlah tinggi, hal ini dapat merangsang perekrutan kondroklas ke dalam kartilago hipertrofik. Peran VEGF dalam proses pembentukan tulang endokondral adalah meningkatkan respon angiogenik, meningkatkan resorpsi tulang rawan dan pengantiannya oleh kallus tulang. (Hu dan Olsen, 2016)

Pada fase remodeling, penggantian anyaman tulang dengan tulang baru membutuhkan proses resorpsi tulang yang dimediasi osteoklas dan pembentukan tulang yang dimediasi oleh osteoblas. VEGF mempengaruhi fungsi kedua jenis sel tulang tersebut, dan dalam kondisi jumlah VEGF yang normal dapat mempertahankan proses remodeling tulang yang normal. Beberapa faktor osteogenik, seperti TGF- β 1, IGF dan PDGF-BB, dilesetelahn dari matriks tulang atau pra-osteoklas selama proses resorpsi tulang. (Hu dan Olsen, 2016; Rizal BM *et.al.*, 2018)

Dapat disimpulkan pada proses penyembuhan tulang, VEGF berperan pada proses terjadinya hematoma dan berkontribusi dalam perekrutan makrofag/monosit. Dalam pembentukan tulang endokondral selama perbaikan tulang, VEGF juga berperan dalam induksi pembentukan tulang rawan dan merangsang resorpsi tulang rawan dan menggantinya dengan tulang lamellar. VEGF juga berperan dalam mengatur pematangan dan diferensiasi osteoklas sehingga VEGF diperlukan untuk pemeliharaan dan regenerasi tulang normal. VEGF diketahui dapat diukur setelah tiga hari inkubasi. Kadar normal VEGF dalam serum adalah 62-707 pg/ml (Hu dan Olsen, 2016; Rizal BM *et.al.*, 2018)

2.8. BMP-6 (*Bone Morphogenetic Protein*)

Growth factors penting dalam proses penyembuhan tulang dan termasuk di dalamnya adalah *bone morphogenic proteins* (BMPs). BMP terbentuk dari residu sistein yang telah matang pada ujung karboksil. BMPs adalah molekul kecil kaya protein (19-30 kDa) dengan pH antara 4.9-5.1. *Bone morphogenetic protein* adalah kelompok *growth factor* juga dikenal sebagai sitokin, termasuk dalam famili TGF- β , sebagai salah satu grup dari 15 protein yang mampu mentransmisi jaringan ikat ke tulang yang dibutuhkan untuk proses osteoinduksi. *Bone morphogenetic protein* merupakan faktor pertumbuhan multi-fungsi dengan fungsi sebagai. yang mengkadarkan osifikasi endokondral, fraktur awal, dan perbaikan tulang rawan. Kegiatan BMP pertama kali diidentifikasi pada tahun 1960, dan

sampai saat ini 20 anggota keluarga BMP tersebut telah diidentifikasi. Penemuan terbaru disebutkan bahwa BMPs termasuk faktor differensiasi dan mempunyai kemampuan untuk mengubah sel progenitor ke mineral yang membentuk osteoblas serta menstimulasi proliferasi vaskular. *Bone morphogenic proteins* untuk aplikasi regenerasi tulang adalah BMP-2 , BMP-6 dan BMP-7. Kadar BMP-6 didapatkan mulai hari ke-7 dan puncaknya pada minggu kedua sampai dengan ke empat (Kini & Nandessh, 2012; Moghadam *et.al.*. 2004; Sheikh *et.al.*, 2005; Planell *et.al.*, 2009)

Anggota famili BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) dibagi menjadi empat subgrup yang berbeda tergantung pada susunan asam amino primer. Grup pertama terdiri dari BMP-2, BMP-4 dan grup kedua meliputi BMP-5, -6, dan -7. Kelompok ketiga meliputi GDF-5 (atau BMP-14), GDF-6 (atau BMP-13) dan GDF-7 (atau BMP-12), dan grup keempat meliputi BMP-3 (atau osteogenin) dan GDF-10 (atau BMP-3b). Kadar normal BMP-6 dalam serum adalah 0-118 pg/ml. BMP-1 bukan merupakan anggota TGF- beta superfamily dan mungkin memainkan peran dalam memodulasi aksi proteolisis antagonis/ikatan protein BMP seperti noggin dan kondrin. BMP berikatan pada reseptor serine/threonin kinase yang merupakan reseptor transphosphorilase tipe 1, setelah itu kaskade sinyal intraseluler Smad dimulai. BMP adalah morfogen pleiotropik dan memainkan peran penting dalam regulasi pertumbuhan, diferensiasi dan apoptosis berbagai macam sel, meliputi osteoblas, konfrobilas, sel-sel syaraf dan sel-sel epitel. Lebih lanjut telah ditunjukkan bahwa heterodimer BMP seperti BMP-4/-7 dan

BMP-2/-7 mempunyai aktivitas osteoinduktif meregulasi secara lebih efisien diferensiasi dan proliferasi sel-sel mesenkimal menjadi osteoblas secara *in vitro* dan *in vivo* (Fragiskos, 2013; Miloro *et.al.*, 2016).

BMP memainkan peran penting dalam mempertahankan massa tulang dan menginduksi diferensiasi *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) menjadi osteoblas, meningkatkan jumlah osteoblas dewasa dan meningkatkan kemampuan diferensiasi osteoblas. jalur sinyalnya. Studi klinis telah menunjukkan bahwa BMP memiliki fungsi merangsang penyembuhan tulang yang patah. Di antara lebih dari 20 anggota keluarga BMP, BMP-2, BMP-4, BMP-6, dan BMP-9 memainkan peran penting dalam osifikasi. BMP menginduksi serangkaian kaskade peristiwa kondroosteogenesis, meliputi kemotaksis, proliferasi dan diferensiasi sel mesenkimal dan osteoprogenitor, angiogenesis dan sintesis matriks ekstraseluler terkontrol. Efek regulatori tergantung pada macam sel target, tahap diferensiasi, konsentrasi lokal ligan serta interaksi dengan faktor sirkulasi lainnya. Konsentrasi BMP *in vitro* yang rendah mempengaruhi diferensiasi sel induk mesenkimal menjadi adiposit. Kadar BMP *in vitro* diketahui mulai meningkat pada hari keempat atau kelima (Fragiskos, 2013; Miloro *et.al.*, 2016).

Pada analisis komprehensif aktivitas osteogenik 14 macam BMP, BMP-2, BMP-6 dan BMP-9 mungkin merupakan yang paling mampu menginduksi diferensiasi osteoblas dan sel-sel progenitor mesenkimal, sementara kebanyakan BMP (kecuali BMP-3 dan -13) dapat mempromosi

diferensiasi terminal dari prekursor osteoblas dan osteoklas. BMP dapat menstimulasi sintesis dan sekresi dari tulang lain dan angiogenic growth factors seperti *insulin-like growth factor* (IGF) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Mereka juga menstimulasi formasi tulang dengan secara langsung mengaktivasi sel-sel endotel untuk mensimulasi angiogenesis (Fragiskos, 2013; Miloro *et.al.*, 2016).

Gen BMP-6 mengandung 513 residu asam amino, yang meliputi peptida N-terminal dengan 23 residu asam amino dan propeptida dengan 490 residu asam amino. . Berdasarkan homologi urutan asam aminonya, BMP-5, BMP-6, dan BMP-7 membentuk subfamili dari keluarga BMP. Perbedaan terbesar antara struktur BMP-6 dan BMP-7 terletak pada heliks histon H3 (residu asam amino 65-73) dalam struktur kristal BMP-6 berbeda dengan struktur kristal BMP-7 (Yang *et.al.*, 2014).

Berdasarkan penelitian *invivo* menyatakan bahwa BMP-6 dapat merangsang pembentukan tulang. Penelitian *in vitro* telah menunjukkan bahwa BMP-6 dapat secara signifikan merangsang osteogenesis dan diferensiasi kondroblas dan induksi osteogenesis. Berdasarkan penelitian Mizrahi *et.al.*, menyatakan bahwa BMP-6 dan BMP-2 dapat menginduksi diferensiasi *in vitro* MSC tikus menjadi osteoblas. Pada penelitian tersebut menemukan bahwa pada MSC, kecepatan induksi osteogenesis yang dimediasi BMP-6 lebih cepat daripada BMP-2 dan osteogenesis juga lebih tinggi daripada BMP-2. Selain penelitian tersebut penelitian yang dilakukan oleh Zachos, et al. menyatakan bahwa pada proses transfer gen BMP-6 ke

dalam sel punca mesenkim osteogenik (OMSC) mereka menemukan tingkat kadar indikator osteogenesis dalam sel BMSC meningkat, matriks ekstraseluler meningkat dan mineralisasi yang meningkat. Pada penelitian tersebut menunjukkan bahwa BMP-6 dapat merangsang diferensiasi BMSC menjadi osteoblas. Jalur sinyal yang terlibat dalam induksi osteogenesis MSC yang dimediasi BMP-6 memiliki banyak kesamaan dengan anggota keluarga BMP lainnya, yang diatur oleh osterix (SP7). Kadar BMP-6 juga diregulasi oleh estrogen. Olehnya dapat disimpulkan bahwa fungsi dari BMP-6 adalah penginduksi diferensiasi sel mesenkin menjadi osteoblas, meningkatkan kadar indikator osteogenesis, merangsang kalsifikasi matriks seluler, dan terlibat dalam osteogenesis dan perbaikan tulang. BMP-6 juga berfungsi menginduksi osteogenesis (Yang *et.al.*, 2014).

2.9. Osteokalsin

Osteokalsin juga dikenal sebagai *gamma-carboxyglutamic acid-containing protein* atau *bone gla protein*. Osteokalsin adalah protein kecil, non kolagen disekresikan berkaitan dengan matriks mineral tulang. Osteokalsin adalah kumpulan asam amino, di mana 5,6% di antaranya disekresikan dan diproduksi oleh osteoblas, selain itu osteokalsin juga dihasilkan oleh odontoblas gigi dan kondrosit hipertrofik. Kadar normal osteokalsin adalah 1,1-11 ng/ml. Kedua bentuk osteokalsin, baik dengan gugus karboksi ataupun tidak disekresikan oleh osteoblas kemudian dilesetelahn ke dalam sistem sirkulasi. Osteoblas adalah sel pembentuk

tulang yang berasal dari sel progenitor dan ditemukan dipermukaan tulang. Sel ini bertanggung jawab pada pembentukan dan proses mineralisasi tulang. Osteoblas berasal dari *pluripotent mesenchymal stem cells* dan sel ini dapat juga berkembang menjadi kondrosit, adiposit, myoblas, dan fibroblast. Osteoblas yang matang akan mengkadarkan beberapa senyawa kimia yang bisa digunakan identifikasi aktivitas osteoblas dalam serum yang biasa diberi istilah *biochemical bone marker* yaitu: kolagen tipe I, alkalin fosfatase, osteopontin dan osteokalsin (Zoch *et.al.*, 2016).

Singkatnya osteokalsin merupakan salah satu penanda proses pembentukan tulang. *Osteokalsin* merupakan protein non kolagen dalam matriks tulang, yang disintesis oleh osteoblas, dan disekresi ke dalam cairan jaringan penyokong utama tulang. Fragmen osteokalsin ini akan dilesetelahn ke dalam peredaran darah dan dapat diukur kadarnya. Selain itu, dalam aliran darah terdapat bentuk osteokalsin utuh dan N-MID- fragmen. (Stabler, 2004; Ferri, 2004; Ott, 1999; Roche Diagnostic, 2004). Walaupun osteokalsin adalah petanda formasi tulang, tetapi pada saat penyerapan fragmen osteokalsin juga dilepas ke dalam peredaran darah, jadi semakin besar penyerapan yang terjadi semakin banyak fragmen osteokalsin dalam darah (Sennang AN *et.al.*, 2006). Osteokalsin juga disebut sebagai protein *γ -carboxyglutamic acid* (Gl a) tulang atau BGP. Osteokalsin digunakan sebagai penanda serum pembentukan tulang dan diyakini bertindak dalam matriks tulang untuk mengatur mineralisasi selain hal tersebut osteokalsin juga memainkan beberapa fungsi yaitu dalam

bentuknya yang tidak dikarboksilasi osteokalsin bertindak sebagai hormon dalam tubuh yang berfungsi memberi sinyal pada pankreas, lemak, otot, testis dan otak, di dalam pankreas osteokalsin bekerja pada sel beta menyebabkan sel beta di pankreas mengeluarkan lebih banyak insulin, dalam sel-sel lemak osteokalsin memicu pelepasan hormon adiponektin yang meningkatkan sensitivitas terhadap insulin, pada otot osteokalsin bekerja pada miosit untuk meningkatkan ketersediaan dan pemanfaatan energi dan dengan cara ini meningkatkan kapasitas olahraga, di testis osteokalsin bekerja pada sel Leydig merangsang biosintesis testosteron dan karenanya mempengaruhi kesuburan pria, di otak, osteokalsin memainkan peran penting dalam perkembangan dan fungsi (Zoch *et.al.*, 2016).

Osteokalsin yang merupakan protein 5,8 kDa disintesis oleh osteoblas, odontoblas dan hipertrofik kondrosit yang mengikat hidroksiapatit dalam matriks tulang. Sintesis osteokalsin bergantung pada kehadiran vitamin K dan vitamin D. Osteokalsin membutuhkan vitamin K

oleh karena merupakan ko-faktor esensial untuk post translasi - *carboxyglutamate* (gla) yang bertanggung jawab untuk mengikat kalsium. Pada ujung lainnya, OCN bisa juga berinteraksi dengan protein lain, termasuk permukaan sel reseptor. Fungsi ini mempengaruhi osteokalsin sebagai molekul aktif dalam pengorganisasian matriks ekstraselular. (Fogelman *et.al.*, 2012 ; Seibel, 2005).

Osteokalsin merupakan protein non kolagen yang terdapat paling banyak dalam tulang. Osteokalsin berperan penting dalam proses mineralisasi dan proses homeostasis ion kalsium. Osteokalsin merupakan salah satu biomarker *bone formation* dengan cara berpartisipasi dalam regulasi pertumbuhan kristal hidroksiapatit dan berfungsi dalam mengatur *bone remodelling* melalui mekanisme umpan balik negatif. Osteokalsin yang rendah dikaitkan dengan peningkatan resiko patah tulang karena OCN merupakan salah satu pertanda pembentukan tulang (Lieberman & Friedlaender, 2007 ; Deliberador *et.al.*, 2014).

Aktivasi osteoblas diatur saraf simpatis yang menyampaikan informasi keseimbangan energi dari adiposit. Saraf simpatis yang terhubung dengan osteoblas menggunakan stimulasi reseptor-2-adrenergik melalui dua jalur: protein kinase A dan molekul. Diferensiasi osteoblas dipengaruhi oleh berbagai faktor pertumbuhan, hormon dan vitamin termasuk bFGF, IGF-1, TGF-beta, TNF-alpha, 1,25-dihydroxyvitamin D3, endothelin-1 , kalsitonin, hormon paratiroid, hormon tiroid tiroksin (T4), hormon tiroid tri-iodothyronine (T3), glukokortikoid dan progesteron. Setelah osteoblas aktif, osteoblas akan mengaktifkan *Osteokalsin* dengan menggunakan dekarboksilasi osteoblas. Osteokalsin disekresikan oleh osteoblas dengan modifikasi pasca-translasi yang berbeda. Osteokalsin memodulasi diferensiasi, dan mineralisasi kondrosit (Oryan *et.al.*, 2015).

Siklus remodeling tulang dimulai ketika sel-sel prekursor osteoklas menerima sinyal dari osteoblas untuk berdiferensiasi menjadi osteoklas.

Osteoklas yang matur kemudian mensintesis enzim proteolitik yang mencerna matriks kolagen. Resorpsi tulang ini merupakan tahapan awal siklus remodeling yang diatur oleh apoptosis osteoklas. Fase selanjutnya dari siklus remodeling preosteoblas ditarik dari *mesenchymal stem cell* dalam sumsum tulang. Osteoblas matur mensintesis protein tulang, terutama osteokalsin dan mengatur mineralisasi tulang dan menjadi osteosit. Sehingga osteokalsin dapat dipertimbangkan sebagai marker fungsi osteoblas (Seibel, 2005).

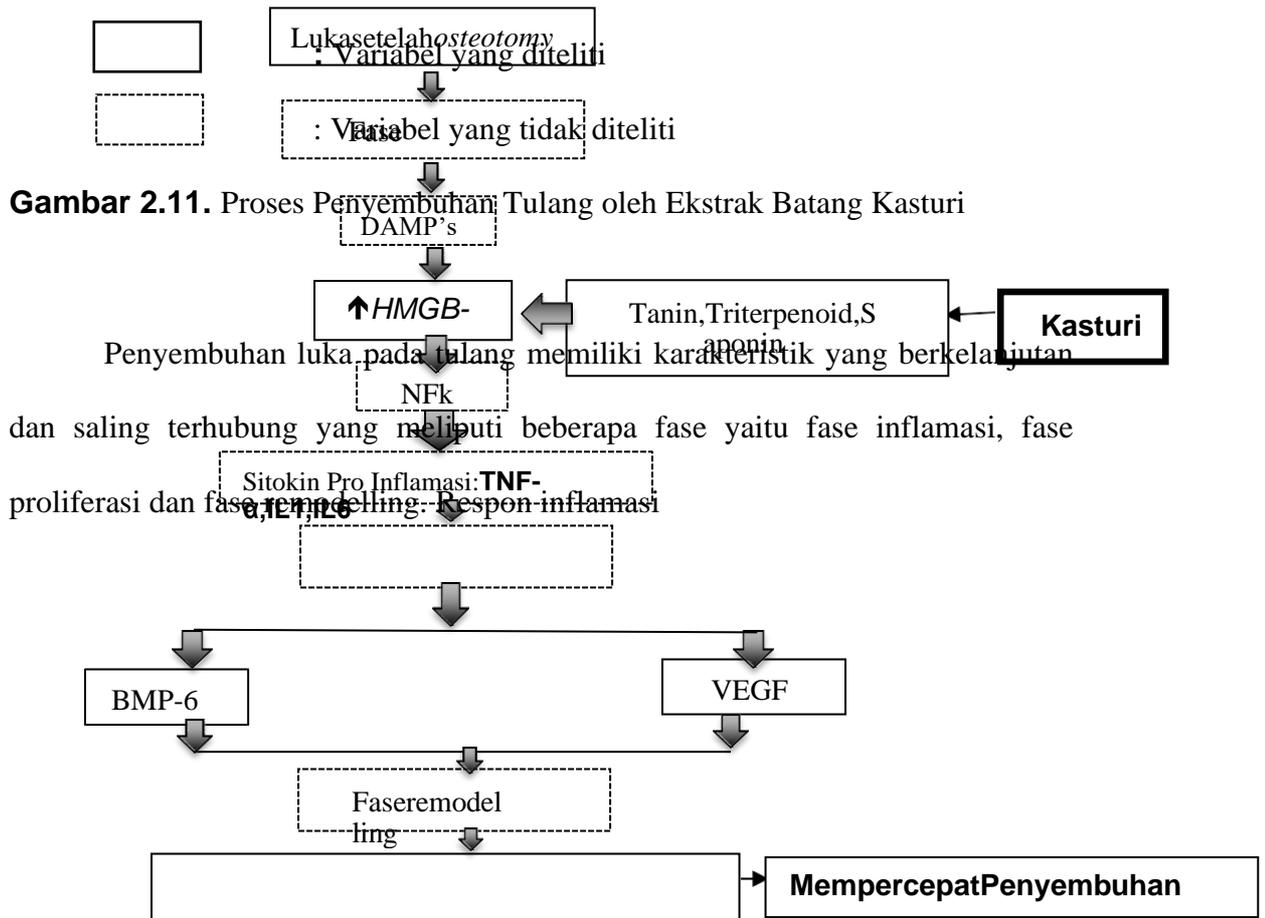
Tes osteokalsin serum menggunakan metode Elecsys N-MID Osteocalcin Assay dengan prinsip sandwich yaitu dua antibodi monoclonal yang spesifik terhadap kelompok penanda antigen (epitop) di N-MID fragment dan N-terminal fragment} memberikan hasil dalam satuan ng/mL. Adapun produksi osteokalsin terjadi pada tujuh atau 21 hari setelah patah tulang (Igarashi A dan Yamaguchi M, 2003; Roche Diagnostic, 2004).

2.10. Gel Ekstrak *Mangifera casturi*

Gel merupakan sistem semi padat yang pergerakan medium pendispersinya terbatas oleh sebuah jalinan jaringan tiga dimensi dari partikel-partikel atau makromolekul yang terlarut pada fase pendispersi. Selain digunakan secara luas sebagai bahan pembawa dalam formulasi farmasetik oral dan topikal, senyawa ini juga digunakan secara luas dalam produk kosmetik dan makanan. Keuntungan dari bahan sediaan gel adalah

bahan yang tidak toksik dan tidak mengiritasi, rasa dingin di kulit, mudah mengering, dan mudah dicuci (Sayuti *et.al.*, 2015).

2.11. Kerangka teori



Gambar 2.11. Proses Penyembuhan Tulang oleh Ekstrak Batang Kasturi

Penyembuhan luka pada tulang memiliki karakteristik yang berkelanjutan dan saling terhubung yang meliputi beberapa fase yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase remodelling. Respon inflamasi

memuncak dalam 24 jam pertama dan selesai setelah 7 hari. Setelah terjadinya suatu luka setelah pengeburan tulang akan ada aktivasi *innate immunity* sebagai respon pertahanan pertama setelah terjadinya kerusakan jaringan. Selain *innate immunity*, sel-sel yang mengalami nekrotik setelah luka setelah ekstrak gigi akan memberi sinyal “danger signals” yang ditandai dengan aktivasi DAMPs (*Damage-Associate Molecular Patterns*). DAMPs merupakan molekul di dalam sel yang merupakan komponen sistem imun alami yang bekerja ketika terjadi kerusakan jaringan. DAMPs memulai respon mekanisme pertahanan tubuh terhadap inflamasi, dengan mengikat ke reseptor spesifik untuk mengaktifkan peradangan dan memulai perekrutan sel neutrofil dan monosit, sitokin yang optimal untuk perbaikan jaringan. Aktivasi DAMPs membuat HMGB-1 berikatan dengan RAGE dan juga TLR2/TLR4 melalui jalur MyD88 yang menginduksi transkripsi jalur NF- κ B (Yang *et.al.*, 2012; Aoyagi *et.al.*, 2018; Hu dan Olsen, 2016; Zindel and Kubes, 2019).

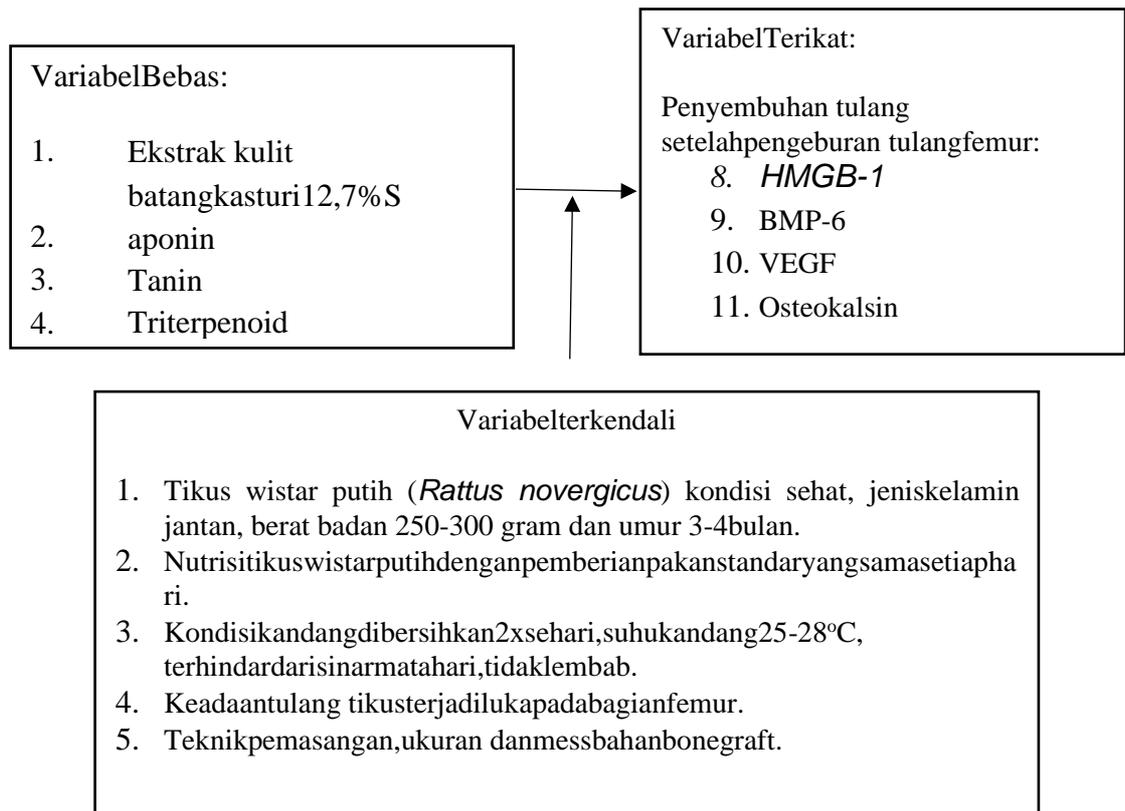
Aktivasi jalur NF- κ B dapat meningkatkan aktivasi sitokin proinflamasi seperti IL1, IL6 dan TNF α . Aktivasi beberapa sitokin proinflamasi tersebut dapat meningkatkan aktivitas BMP 6 dan VEGF, dimana kedua biomarker ini berperan dalam proses proliferasi. Fase proliferasi terjadi setelah proses inflamasi sampai minggu ke-3. Pada fase proliferasi VEGF berperan sebagai salah satu faktor penting dalam perbaikan pembuluh darah yang rusak. VEGF merangsang pembentukan proliferasi sel endotel, menstimulasi angiogenesis, vasodilatasi dan meningkatkan permeabilitas

vaskular. Pembentukan vaskular pada fase penyembuhan tulang merupakan faktor kunci fase pertama pada fraktur dan regenerasi tulang. Aktivasi BMP-6 pada fase proliferasi mampu menginduksi diferensiasi osteoblas dan sel-sel progenitor mesenkim. Sehingga mampu mempercepat proses penyembuhan tulang (Fragiskos, 2013; Miloro *et.al.*, 2016; Hu dan Olsen, 2016;).

Fase *regenerasi/remodeling* merupakan fase terakhir yang berlangsung dari minggu ke 3 sampai bulan ke-4. Fase ini merupakan suatu proses yang kompleks yang melibatkan resorpsi tulang yang diikuti dengan pembentukan tulang baru. Siklus remodeling tulang dimulai ketika sel-sel prekursor osteoklas menerima sinyal dari osteoblas untuk berdiferensiasi menjadi osteoklas. Osteoklas yang matur kemudian mensintesis enzim proteolitik yang mencerna matriks kolagen. Resorpsi tulang ini merupakan tahapan awal siklus remodeling yang diatur oleh apoptosis osteoklas. Fase selanjutnya dari siklus remodeling preosteoblas ditarik dari *mesenchymal stem cell* dalam sumsum tulang. Osteoblas matur mensintesis protein tulang, terutama osteokalsin dan mengatur mineralisasi tulang dan menjadi osteosit. Sehingga osteokalsin berperan sebagai sebagai marker aktif nya osteoblas pada fase proliferasi. Pada fase ini juga ditemukan biomerker BMP-6, BMP-6 berperan dalam melakukan kendali pada reaksi kompleks antara sel osteoclast dan osteoblas dalam melakukan tahap remodeling Pemberian ekstrak kulit batang kasturi yang mengandung saponin tannin dan triterpenoid dapat bertindak sebagai imunomodulator yang dapat

meningkatkan aktivasi HMGB-1 sehingga dapat meningkatkan aktivitas VEGF, BMP-6 dan osteokalsin (Seibel, 2005; Sutomo,2017; Cule *et.al.*,2018).

2.12. Kerangka Konsep



Gambar 2.11. Skema Kerangka Konsep Potensi Ekstrak Kulit Batang *Mangifera casturi* 12.7% Terhadap Kadar *HMGB-1*, BMP-6, VEGF dan Osteokalsin Selama Proses Penyembuhan Tulang

2.13. Hipotesa

Terdapat peningkatan kadar HMGB-1, VEGF, BMP-6, dan osteokalsin selama regenerasi tulang setelah diberikan ekstrak kulit batang *Mangifera casturi* 12,7 %.