

**UJI SIMULASI MOLEKULAR DOKING EKSTRAK  
*CHLORELLA VULGARIS* TERHADAP MARKER  
OSTEOGENIK YANG MEMPENGARUHI OSSEOINTEGRASI**

**TESIS**



**OLEH:**

**MUTHIA MUTMAINNAH BACHTIAR**

**J015202005**

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

**2023**

**UJI SIMULASI MOLEKULAR DOKING EKSTRAK  
*CHLORELLA VULGARIS* TERHADAP MARKER  
OSTEOGENIK YANG MEMPENGARUHI OSSEOINTEGRASI**

**TESIS**

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh  
Gelar Profesi Spesialis-1 dalam Bidang Ilmu Prostodonsia  
pada Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Fakultas  
Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**OLEH:**

**MUTHIA MUTMAINNAH BACHTIAR**

**NIM. J015202005**

**PEMBIMBING:**

**drg. IRFAN DAMMAR, Sp.Pros., Subsp. MFP(K)**

**drg. ACING HABIBIE MUDE, Ph.D., Sp.Pros.,Subsp. OGST(K)**

**UJI SIMULASI MOLEKULAR DOKING EKSTRAK  
CHLORELLA VULGARIS TERHADAP MARKER  
OSTEOGENIK YANG MEMPENGARUHI OSSEOINTEGRASI**

OLEH:

**MUTHIA MUTMAINNAH BACHTIAR**

**NIM. J015202005**

Setelah membaca tesis ini dengan seksama, menurut pertimbangan kami,  
Tesis ini telah memenuhi persyaratan ilmiah

Makassar, November 2023

Pembimbing I



drg. Irfan Dammar, Sp.Proes.,

Subsp.MFP(K)

NIP. 19770630 200904 1 003

Pembimbing II

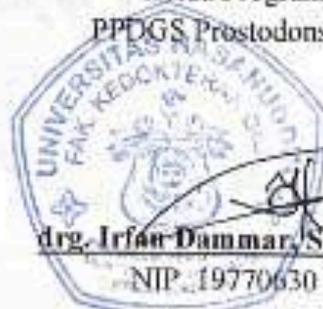


drg. Acing Habibi Mude, Ph.D.,

Sp.Proes., Subsp. OGSTK(K)

NIP. 19810207 200812 1 002

Mengetahui,  
Ketua Program Studi (KPS)  
PPDGS Prosthodontia FKG UNHAS



drg. Irfan Dammar, Sp.Proes., Subsp.MFP(K)

NIP. 19770630 200904 1 003

**PENGESAHAN UJIAN TESIS**

**UJI SIMULASI MOLEKULAR DOKING EKSTRAK  
*CHLORELLA VULGARIS* TERHADAP MARKER  
OSTEOGENIK YANG MEMPENGARUHI OSSEOINTEGRASI**

Diajukan Oleh:

**MUTHIA MUTMAINNAH BACHTIAR**

**NIM. J015202005**

Setelah membaca tesis ini dengan seksama, menurut pertimbangan kami,

Tesis ini telah memenuhi persyaratan ilmiah

Telah disetujui:

Makassar, November 2023

Pembimbing I,

drg. Irfan Dammar, Sp.Pro.,  
Subsp.MFP(K)

NIP. 19770630-200904 1 003

Pembimbing II,

drg. Aceng Habibi Mude, Ph.D.,  
Sp.Pro., Subsp. OGSTK(K)

NIP. 19810207 200812 1 002

Ketua Program Studi (KPS)  
PP-OGS Prosthodontia FKG UNHAS

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

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi  
Universitas Hasanuddin

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

TESIS

**UJI SIMULASI MOLEKULAR DOKING EKSTRAK  
CHLORELLA VULGARIS TERHADAP MARKER  
OSTEOGENIK YANG MEMPENGARUHI OSSEOINTEGRASI**

OLEH:

**MUTHIA MUTMAINNAH BACHTIAR**

**NIM. J015202005**

Telah Disetujui:  
Makassar, November 2023

1. Penguji I: drg. Irfan Dammar, Sp.Pro.,Subsp.MFP(K)
2. Penguji II: drg. Acing Habibie Mude,Ph.D.,Sp.Pro.,Subsp.OGSTK(K)
3. Penguji III: Prof. drg. Moh.Dharma Utama, Ph.D., Sp.Pro., Subsp. PKIKG(K)
4. Penguji IV: Dr. drg. Ike Damayanti Habar, Sp. Pros., Subsp. PKIKG(K)
5. Penguji V: drg. Rifaat Nurrahma, Sp.Pro., Subsp. MFP(K)



Mengetahui,  
Ketua Program Studi (KPS)  
PPDGS Protesdonsia FKG UNHAS



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

## PERNYATAAN KEASLIAN KARYA TULIS ILMIAH

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muthia Mutmainnah Bachtiar

NIM : J015202005

Program Studi : Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Prostodonsia Fakultas  
Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa karya tulis akhir yang saya buat ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan karya tulis ini merupakan hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, November 2023



Muthia Mutmainnah Bachtiar

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena hanya berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Uji Simulasi Molekular Doking Ekstrak *Chlorella Vulgaris* Terhadap Marker Osteogenik yang Mempengaruhi Osseointegrasi”. Penulisan tesis ini bertujuan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Spesialis Prostodonsia-1 di Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin. Tesis ini juga diharapkan dapat memberikan manfaat bagi para pembaca dan peneliti lainnya untuk menambah pengetahuan dalam bidang ilmu kedokteran gigi maupun masyarakat umum.

Dalam perjalanan penulisan tesis ini, penulis menghadapi berbagai hambatan. Namun, berkat bantuan, bimbingan, dan motivasi dari berbagai pihak, akhirnya penulisan tesis ini dapat terselesaikan dengan baik dan tepat waktu. Dengan penuh rasa terima kasih, penulis ingin mengucapkan penghargaan setinggi-tingginya kepada:

1. Pembimbing tesis **drg. Irfan Dammar, Sp.Pros., Subsp. MFP(K)** dan **drg. Acing Habibie Mude, Ph.D., Sp.Pros., Subsp. OGST(K)** yang telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, saran, serta ilmu selama penelitian dan penyusunan tesis ini, serta memberikan dukungan selama proses Pendidikan Spesialis di Bidang Prostodonsia.
2. **Prof. drg. Moh. Dharmautama, Ph.D., Sp.Pros., Subsp. PKIKG(K)**, **Dr. drg. Ike Damayanti Habar, Sp.Pros., Subsp. PKIKG(K)**, dan **drg. Rifaat Nurrahma, Sp.Pros., Subsp. MFP(K)** selaku penguji yang telah bersedia memberikan arahan, waktu, dan kesempatan untuk memberikan bimbingan kepada penulis sehingga karya tulis ilmiah ini dapat menjadi lebih baik.
3. **Kementerian Kesehatan Republik Indonesia**, selaku pemberi bantuan biaya penelitian melalui Beasiswa Pendidikan Dokter Spesialis/Pendidikan Dokter Gigi Spesialis.
4. Bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. **Rosmaniar, S.Si**, laboran pendamping di Laboratorium FIKP Unhas, yang membantu dalam pelaksanaan

penelitian tesis. **Israini Wiyulanda, M.Sc, dan StudioBio**, tim pendamping dan pengarah dalam pelaksanaan penelitian tesis ini. **Suriana dan BPBAP Takalar**, penyedia bahan baku utama dalam penelitian tesis ini.

5. Staf Dosen PPDGS Prostodonsia FKG Unhas **Prof. Dr. drg. Bahruddin Talib, M.Kes., Sp.Pros., Subsp. PKIKG(K), Prof. Dr. drg. Edy Machmud, Sp.Pros., Subsp. OGST(K), drg. Eri Hendra Jubhari, M.Kes., Sp.Pros., Subsp. PKIKG(K), drg. Muhammad Iqbal, Ph.D., Sp.Pros., Subsp. PKIKG(K), drg. Vinsensia Launardo, Sp. Pros., Subs. MFP(K), drg. Rahmat, Sp.Pros.**, atas saran, kritik, masukan, support, arahan, dan bimbingan selama studi perkuliahan, pengerjaan kasus klinik, dan tahap penelitian, sehingga karya ilmiah ini dapat terselesaikan dengan baik.
6. Staf Akademik dan Tata Usaha Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin. Terutama kepada **Kak Bia**, atas bantuan dan saran dalam pelaksanaan penelitian tesis ini.
7. Suami tercinta dan terbaik **Jamaluddin Fitrah Alam, S.Pi., M.Si., Ph.D**, yang senantiasa memberikan doa, dukungan, dan motivasi selama penulis menyelesaikan karya tulis ini. Terima kasih atas kesabaran dan kesetiiaannya.
8. Orang tua tersayang dan terhebat Bapak **Bachtiar Sitaba, S.H.**, Ibu **drg. St. Maisarah Alwany, MARS**, dan Ibu Mertua **Siti Hasnah**, yang memberikan doa, dukungan, dan kasih sayang kepada penulis dalam bentuk moril dan materil, yang sangat berarti dalam menyelesaikan pendidikan spesialis ini.
9. Saudara-saudari **dr. Nurul Qalbi Bachtiar, Fath Mubaraq Bachtiar, S.Ked., Hadiid Afief Bachtiar** yang senantiasa memberikan dukungan, semangat, dan doa kepada penulis dalam menyelesaikan tesis ini.
10. Teman-teman **Angkatan XIV PPDGS Prostodonsia FKG Unhas**, kakak-kakak **drg. Eka Fibrianti, drg. Risnawati, drg. Nurimah Wahyuni, drg. Ainun Bazira, drg. Astri Al-Hutami Aziz, drg. Ludfia Ulfa, drg. Iswanto Sabirin, drg. Probo Damoro Putro**, dan **drg. Aksani Taqwim**, atas kebersamaan, dukungan, dan kebersamaan selama menjadi residen. Semoga silaturahmi dan kekeluargaan kita bisa berlangsung selamanya, walaupun sudah kembali ke tempat tugas masing-masing.

11. Senior-senior PPDGS Prostodonsia FKG Unhas, terutama **drg. Ian Afifah Sudarman, Sp.Pros., drg. Mariska Juanita, Sp.Pros., drg. Nur Inriany, Sp.Pros., drg. Raodah,** dan **drg. Fitri Endang,** atas bantuan, dukungan, dan sarannya selama menjadi residen.
12. Seluruh residen **Angkatan XV, XVI, XVII, XVIII, dan XIX PPDGS Prostodonsia FKG Unhas,** yang telah memberikan bantuan dan dukungan kepada penulis dalam menempuh pendidikan bersama.
13. Seluruh keluarga, sahabat, dan orang-orang yang tidak dapat disebutkan satu per satu, atas bantuan dan dukungan dalam penyusunan dan penyelesaian karya tulis penelitian tesis ini.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih memiliki banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis senantiasa menerima kritik dan saran yang diberikan oleh pembaca. Akhir kata, semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi kita semua dalam pengembangan ilmu pengetahuan ke depannya.

Makassar, November 2023



Muthia Mutmainnah Bachtiar

## ABSTRAK

**Latar belakang:** Upaya meningkatkan osseointegrasi, penggunaan bahan alam, khususnya mikroalga *Chlorella vulgaris*, muncul sebagai pilihan karena kandungan kimianya yang dapat mendukung proses penyembuhan. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak *Chlorella vulgaris* dapat mempercepat pembentukan jaringan dengan merangsang pertumbuhan fibroblast. Namun, interaksi molekuler antara senyawa-senyawa dalam ekstrak *Chlorella vulgaris* dengan komponen sel tulang belum dipahami secara menyeluruh. Oleh karena itu, pendekatan *in silico* menggunakan metode molekular docking diharapkan dapat memberikan wawasan mendalam tentang ikatan molekuler antara senyawa-senyawa aktif dalam *Chlorella vulgaris* dengan biomarker osseointegrasi.

**Tujuan:** Untuk mengetahui senyawa aktif *Chlorella vulgaris* dan menganalisis afinitas ikatan kompleks molekular doking antara senyawa aktif *Chlorella vulgaris* dan lima biomarker osteogenik meliputi osteoponti, osteokalsin, BMP-4, BMP-2, dan RUNX2 yang mempengaruhi osseointegrasi.

**Bahan dan Metode:** Sampel ekstrak *Chlorella vulgaris* diuji menggunakan GCMS untuk mengidentifikasi senyawa aktif dan formulasi kimia yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Senyawa aktif *Chlorella vulgaris* diambil dari database PubChem, sedangkan sampel protein biomarker osteopontin, osteokalsin, BMP-4, BMP-2, dan RUNX2 diperoleh dari RSCB PDB. Analisis molekular docking dilakukan antara senyawa aktif *Chlorella vulgaris* (ligan) dan reseptor osteogenik untuk menilai afinitas ikatan dan interaksi yang terbentuk dalam kompleks doking. Interaksi ini melibatkan ikatan hidrogen, van der Waals, pi, dan alkil untuk memahami ikatan kompleks doking yang terbentuk.

**Hasil:** Dari hasil analisis GCMS, sebanyak 21 senyawa aktif dalam ekstrak *Chlorella vulgaris* berhasil diidentifikasi. Selanjutnya, melalui simulasi doking, dilakukan identifikasi interaksi antara 21 senyawa aktif tersebut dan lima protein marker osteogenik. Hasil simulasi menunjukkan bahwa afinitas ikatan yang paling negatif dalam setiap kompleks doking berkisar antara -4 hingga -6 kcal/mol. Dua senyawa yang menunjukkan interaksi paling kuat dengan marker osteogenik adalah 5.alpha.-Pregnan-20-one, 3.alpha.,17-bis(trimethylsiloxy)-, o-methyl oxime, dan ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate, dengan nilai afinitas ikatan mencapai -4 hingga -5,8 kcal/mol.

**Kesimpulan:** Hasil simulasi molekular doking 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 doking. Temuan ini menandakan bahwa *Chlorella vulgaris* memiliki potensi sebagai bahan yang dapat memengaruhi proses remodeling tulang dan osseointegrasi dengan efektif.

## **ABSTRACT**

**Background:** *The quest for enhancing osseointegration has led researchers to explore natural materials, with particular interest in microalgae such as Chlorella vulgaris due to its chemical constituents known to support the healing process. Previous studies have shown that Chlorella vulgaris extract can accelerate tissue formation by stimulating fibroblast growth. However, a comprehensive understanding of the molecular interactions between compounds in Chlorella vulgaris extract and bone cell components is still lacking. Therefore, adopting an in silico approach using molecular docking methods becomes crucial to gain profound insights into the molecular binding between active compounds in Chlorella vulgaris and osseointegration biomarkers.*

**Objective:** *The aim of this study is to identify the active compounds in Chlorella vulgaris and analyze the binding affinities in molecular docking complexes between these active compounds and five osteogenic biomarkers, namely osteopontin, osteocalcin, BMP-4, BMP-2, and RUNX2, all of which play pivotal roles in osseointegration.*

**Materials and Methods:** *To identify the active compounds, Chlorella vulgaris extract samples were subjected to GCMS analysis, which revealed 21 active compounds. Subsequently, these active compounds from Chlorella vulgaris were sourced from the PubChem database, while the biomarker samples, including osteopontin, osteocalcin, BMP-4, BMP-2, and RUNX2, were obtained from the RSCB PDB. Molecular docking analysis was conducted between these active compounds (ligands) and osteogenic receptors to assess the binding affinities and the interactions formed within the docking complexes. The interactions encompassed hydrogen bonds, van der Waals forces, pi interactions, and alkyl bonds, providing a comprehensive understanding of the binding complexes.*

**Results:** *The GCMS analysis successfully identified 21 active compounds in Chlorella vulgaris extract. Through docking simulations, interactions between these 21 active compounds and the five osteogenic markers were elucidated. The results of the simulation revealed highly negative binding affinities ranging from -4 to -6 kcal/mol within each docking complex. Notably, two compounds, namely 5.alpha.-Pregnan-20-one, 3.alpha.,17-bis(trimethylsiloxy)-, o-methyl oxime, and ethyl 2-([(3-cyano-4,6-dimethyl-2-pyridinyl)sulfanyl]methyl)benzoate, exhibited the strongest interactions with osteogenic markers, displaying binding affinity values ranging from -4 to -5.8 kcal/mol.*

**Conclusion:** *The findings from the molecular docking simulations between the active compounds of Chlorella vulgaris and osteogenic markers, including osteopontin, osteocalcin, BMP-4, BMP-2, and RUNX2, signify the potential of Chlorella vulgaris in significantly influencing the bone remodeling process and osseointegration.*

## DAFTAR ISI

Halaman Judul .....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Persetujuan Penelitian Tesis .....	iii
Pengesahan Ujian Tesis .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Lembar Persetujuan Penguji .....	vi
Pernyataan Keaslian Karya Tulis Ilmiah .....	vi
Kata Pengantar .....	vii
Abstrak .....	x
Daftar Isi .....	xii
Daftar Gambar .....	xv
Daftar Tabel .....	xv
BAB I .....	1
PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	7
1.3. Tujuan Penelitian .....	8
1.3.1. Tujuan umum .....	8
1.3.2. Tujuan khusus .....	8
1.4. Manfaat Penelitian .....	9
1.4.1. Manfaat untuk ilmu pengetahuan .....	9
1.4.2. Manfaat untuk bidang kedokteran gigi .....	10
BAB II .....	11
TINJAUAN PUSTAKA .....	11
2.1. Tulang .....	11

2.1.1. Sel-sel tulang.....	12
2.1.2. Remodeling tulang .....	16
2.1.3. Osseointegrasi.....	25
2.1.3.1 Remodeling tulang disekitar implan gigi.....	26
2.1.3.2. Protein biomarker osseointegrasi.....	32
2.2. Chlorella vulgaris.....	36
2.2.1. Kandungan utama C. vulgaris .....	38
2.2.2. Kandungan fitokimia C. vulgaris.....	41
2.3. Molekular Doking.....	44
2.3.1. Definisi.....	44
2.3.2. Tujuan .....	46
2.3.3. Komponen dan prosedur doking.....	47
2.3.4. Penggunaan molekular doking secara umum .....	51
BAB III.....	54
KERANGKA KONSEP, KERANGKA TEORI, HIPOTESIS .....	54
3.1. Kerangka Teori .....	54
3.2. Kerangka Konsep.....	55
3.3. Hipotesis Penelitian .....	56
BAB IV.....	57
METODOLOGI PENELITIAN .....	57
4.1. Jenis Penelitian dan Rancangan Penelitian.....	57
4.2. Lokasi dan Waktu Penelitian .....	57
4.2.1. Lokasi Penelitian.....	57
4.2.2. Waktu Penelitian.....	57
4.3. Sampel Penelitian .....	57
4.3.1. Jumlah Sampel Penelitian.....	57
4.4. Definisi Operasional .....	58

4.5. Alat dan Bahan.....	58
4.6. Prosedur Penelitian .....	59
4.6.1. Pengambilan sampel <i>C. vulgaris</i> .....	59
4.6.2. Ekstraksi dan GCMS .....	59
4.6.3. Analisis in silico (molekular doking) .....	60
4.7. Alur Penelitian .....	62
BAB V .....	63
HASIL PENELITIAN .....	63
5.1. Analisis gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) dan data protein sel tulang.....	63
5.2. Simulasi doking kelima sel protein tulang dan komponen aktif <i>C. vulgaris</i> ..	66
5.2.1. Osteopontin dan <i>C. vulgaris</i> .....	66
5.2.2. Osteokalsin dan <i>C. vulgaris</i> .....	67
5.2.3. BMP-4 dan <i>C. vulgaris</i> .....	69
5.2.4. BMP-2 dan <i>C. vulgaris</i> .....	70
5.2.5. RUNX2 dan <i>C. vulgaris</i> .....	72
BAB VI.....	74
PEMBAHASAN.....	74
6.1. Komponen aktif <i>C. vulgaris</i> .....	74
6.2. Simulasi molekular doking protein sel tulang dan ekstrak <i>C. vulgaris</i> .....	75
BAB VII.....	88
KESIMPULAN dan SARAN .....	88
7.1. Kesimpulan .....	88
7.2. Saran .....	89
Daftar Pustaka.....	91
Lampiran.....	100

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1.</b> Struktur tulang.....	11
<b>Gambar 2.2.</b> Skematik proses osteoblastogenesis.....	13
<b>Gambar 2.3.</b> Representasi skematis dari proses remodeling tulang.....	24
<b>Gambar 2.4.</b> Representasi skematis dari BMU .....	24
<b>Gambar 2.5.</b> Osseointegrasi dan biointegrasi.....	26
<b>Gambar 2.6.</b> Struktur <i>Chlorella vulgaris</i> .....	37
<b>Gambar 2.7.</b> Pembentukan sel <i>Chlorella vulgaris</i> .....	37
<b>Gambar 2.8.</b> Perkembangan biomolekular modeling dan simulasi.....	45
<b>Gambar 2.9.</b> Sistem kerja molekular doking.....	48
<b>Gambar 4.1</b> Alur penelitian.....	62
<b>Gambar 5.1.</b> Struktur kimia 21 senyawa aktif <i>C. vulgaris</i> .....	65
<b>Gambar 5.2.</b> Struktur 3D protein tulang.....	65
<b>Gambar 5.3.</b> Visualisasi 3D molekular doking protein target osteopontin .....	67
<b>Gambar 5.4.</b> Visualisasi 3D molekular doking protein target osteokalsin.....	68
<b>Gambar 5.5.</b> Visualisasi 3D molekular doking protein target BMP-4 .....	70
<b>Gambar 5.6.</b> Visualisasi 3D molekular doking protein target BMP-2.....	71
<b>Gambar 5.7.</b> Visualisasi 3D molekular doking protein target RUNX2 .....	73

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 2.1.</b> Analisis komponen Chlorella kering per100 gr .....	44
<b>Tabel 2.2.</b> Software molekular doking.....	53
<b>Tabel 5.1.</b> List komponen aktif ekstrak <i>C. vulgaris</i> .....	64
<b>Tabel 5.2.</b> Target protein dari RCSB PDB.....	65
<b>Tabel 5.3.</b> Hasil simulasi doking senyawa aktif <i>C. vulgaris</i> dan osteopontin.....	66
<b>Tabel 5.4.</b> Hasil simulasi doking senyawa aktif <i>C. vulgaris</i> dan osteokalsin .....	68
<b>Tabel 5.5.</b> Hasil simulasi doking senyawa aktif <i>C. vulgaris</i> dan BMP-4 .....	69
<b>Tabel 5.6.</b> Hasil simulasi doking senyawa aktif <i>C. vulgaris</i> dan BMP-2 .....	71
<b>Tabel 5.7.</b> Hasil simulasi doking senyawa aktif <i>C. vulgaris</i> dan RUNX2 .....	72

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Kehilangan gigi merupakan masalah kesehatan gigi dan mulut yang banyak muncul di masyarakat karena dapat mengganggu fungsi pengunyahan, bicara, estetis, bahkan interaksi sosial. Berdasarkan laporan RISKESDAS (Riset Kesehatan Nasional) 2018, kehilangan gigi nasional pada usia 35-44 tahun sebesar sebesar 0,1% yang semakin meningkat pada usia 65 tahun ke atas (9%)<sup>1,2</sup>. Untuk menghindari dampak yang tidak diinginkan akibat kehilangan gigi tanpa ada pengganti maka dibuat suatu alat tiruan sebagai pengganti gigi yang sudah hilang. Gigi Tiruan merupakan solusi untuk rehabilitasi rongga mulut untuk mengembalikan fungsi pengunyahan. Guna mendapatkan retensi dan stabilitas yang baik dari gigi tiruan dibutuhkan dukungan implan yang ditempatkan pada daerah edentulous<sup>3</sup>.

Pasien yang menderita kehilangan gigi secara keseluruhan pada maksila dan mandibula membutuhkan rencana perawatan yang lebih komprehensif dibandingkan perawatan klasik menggunakan gigi tiruan penuh konvensional, khususnya pada mandibula<sup>4,5</sup>. Gigi tiruan yang didukung implan terbukti secara efektif memberikan banyak keuntungan yaitu peningkatan retensi, stabilitas, kenyamanan, proprioepsi, dan preservasi volume tulang<sup>5,6</sup>. Pada pemasangan implan gigi, inflamasi dapat terjadi karena trauma pencabutan dan pemasangan implan, tindakan tersebut dapat mengakibatkan terganggunya kontinuitas jaringan dan kerusakan jaringan yang disebut dengan luka. Penyembuhan luka pasca pencabutan gigi dan pemasangan implan gigi melibatkan proses penyembuhan pada

jaringan lunak yaitu jaringan ikat dan epitel gingiva serta pada jaringan keras yaitu tulang alveolar <sup>7</sup>.

Selain itu, keberhasilan jangka panjang dari implan gigi sangat tergantung pada penyembuhan yang cepat dengan integrasi yang aman ke dalam tulang rahang. Permukaan implan gigi telah dikembangkan dalam dekade terakhir terkonsentrasi dalam upaya untuk memberikan lebih cepat peningkatan dalam proses osseointegrasi tulang <sup>8</sup>. Secara klinis, proses osseointegrasi mencerminkan penambatan mekanis implan gigi ke tulang rahang yang bertahan dalam semua kondisi fungsi mulut yang normal. Beberapa hari setelah proses implantasi sampai terjadinya proses remodeling tulang akan terjadi beberapa peristiwa biologis berupa regenerasi tulang yang diatur oleh beberapa faktor pertumbuhan dan diferensiasi yang dilepaskan di sekitar implan gigi <sup>9</sup>. Pembentukan tulang dimulai pada permukaan implan yaitu sebagai respon terhadap sifat permukaan fisiko-kimia, yang dimaksud sebagai kontak osteogenesis <sup>10</sup>.

Untuk meningkatkan perlekatan implan dengan tulang sekitarnya, dapat dilakukan penambahan bahan yang memiliki sifat biokompatibilitas yang baik dengan jaringan <sup>11</sup>. Penggunaan bahan alam yang dinilai memiliki toksisitas minimal sangat dibutuhkan sebagai biomaterial untuk membantu proses osseointegrasi <sup>12</sup>. Mikroalga merupakan salah satu pilihan material dari alam yang memiliki kandungan kimia yang mampu memberikan efek menguntungkan pada jaringan biologis dan mudah didapatkan sehingga bersifat ekonomis <sup>13</sup>. *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) merupakan mikroalga yang banyak digunakan dalam bidang bioteknologi, salah satunya dalam bidang kesehatan <sup>14</sup>. Salah satu penelitian yang dilakukan di bidang kesehatan oleh Dharmautama dkk, menggunakan biomaterial

rumpun laut ekstrak rumput laut *Sargassum polycystum* mampu menghambat pertumbuhan streptococcus mutan dan candida albican pada konsentrasi 2,5% dan 1,25% secara berurutan sehingga dapat diaplikasikan sebagai pembersih gigi tiruan<sup>15</sup>.

Penelitian tentang manfaat ekstrak *C. vulgaris*, salah satunya tentang penggunaan gel ekstrak *C. vulgaris* 5% sebagai bahan bioaktif yang diinjeksikan ke dalam soket sebelum pemasangan implan dapat menstimulasi pertumbuhan dan perkembangan fibroblast serta berifat antiproteolitik dan terbukti mempercepat pembentukan jaringan<sup>10,12</sup>. 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)<sup>12,16-18</sup>. 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<sup>19,20</sup>.

Berdasarkan penelitian *in vivo* yang telah dilakukan sebelumnya, sediaan krim dan gel ekstrak *C. vulgaris* konsentrasi 5% merupakan formulasi terbaik dan memberikan hasil positif dalam membantu remodeling tulang dan penyembuhan jaringan<sup>21,22</sup>. Namun, dalam penerapannya secara *in vivo* belum dapat diketahui secara pasti senyawa dari komponen aktif ini yang dapat berikatan dengan komponen pada jaringan keras dan jaringan lunak sehingga mampu meningkatkan

dan mempercepat regenerasi dan penyembuhan. Melalui pendekatan *in silico* pemodelan biomolekular yang mulai berkembang saat ini dapat menyelesaikan masalah tersebut secara efisien dan dilakukan oleh multidisiplin ilmu<sup>23</sup>.

Metode doking ini merupakan pendekatan baru yang memiliki peran penting dalam memahami mekanisme terkait penggunaan biomaterial berbasis struktur terhadap target dasar<sup>24</sup>. Penggunaan metode doking ini dalam bidang kedokteran gigi masih sangat sedikit, sehingga dapat diperoleh inovasi, digitalisasi kerja sistem biologis, dan modifikasi struktur komponen organik<sup>23</sup>.

Perkembangan metode uji pemodelan biomolekular telah banyak dilakukan untuk memprediksi obat antikanker dengan menggunakan program komputer salah satunya adalah Autodock<sup>25</sup>. Program ini banyak digunakan pada doking senyawa dalam bidang kesehatan, seperti yang dilakukan oleh Acharya dkk. untuk menemukan obat baru pada pengobatan covid-19. Hasil penelitian menggunakan sistem komputer ini menunjukkan simulasi model yang komprehensif terhadap delapan protein virus dalam 24 sistem molekular dalam jangka waktu yang singkat<sup>26</sup>. Adapun penelitian yang dilakukan oleh Aljohani dkk. tentang efek daun semak cemara (*Micromeria biflora*) sebagai obat herbal yang memiliki efek analgesik, antipiretik, dan antiinflamasi. Pada penelitian ini, mereka menggunakan pengujian *in vivo*, *in vitro*, dan *in silico* untuk membuktikan kemampuan senyawa *Micromeria biflora* terhadap COX-1 atau 2. Pengujian doking membantu validasi hasil *in vitro* dan *in vivo* yang menunjukkan bahwa salicilalasin yang diisolasi dari *Micromeria biflora* dapat menghambat alur COX-2 dan menunjukkan keefektifan sebagai pereda nyeri<sup>27</sup>.

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 polieter eter 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. Penelitian selanjutnya akan dilakukan penilaian biologis dan mekanik secara *in vitro* dan *in vivo* sehingga dapat memvalidasi hasil penelitian *in silico* sebelumnya<sup>11</sup>.

Selain itu, penelitian oleh Almerinda dkk. tentang identifikasi peptida sebagai bahan pelapis implan TiO<sub>2</sub> melalui metode doking, mendapatkan 82 peptida memiliki afinitas ikatan yang tinggi dengan integrin  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ , and  $\alpha IIb\beta 3$ . Penggunaan sel progenitor sebagai target dapat mengurangi waktu penyembuhan dan mencegah infeksi, sehingga membuktikan mempercepat remodeling tulang. Hasil penelitian ini menjadi acuan untuk melakukan penelitian *in vitro* lebih lanjut<sup>28</sup>.

Berbagai literatur melaporkan tentang perubahan yang diberikan pada permukaan implan, dapat mempengaruhi osteokuntivitas, osteinduktivitas, dan angiogenesis. Penggunaan bahan sintesis seperti HA dapat meningkatkan osteogenesis dan angiogenesis, serta dapat mengaktifkan makrofak M2 untuk memodulasi lingkungan imunologik yang pada akhirnya akan mempercepat proses osseointegrasi<sup>11</sup>. Penelitian lain melaporkan tingkat osseointegrasi yang dihubungkan dengan marker tulang seperti *runt-related transcription factor* (RUNX2), *alkaline phosphatase* (ALP), *osteocalcin*, dan *osteopontin* mengalami

peningkatan pada proliferasi osteoblas di tahap awal osseointegrasi setelah penambahan bahan lapisan nano-HA pada permukaan implan<sup>29</sup>. Selain biomarker tersebut, terdapat *bone morphogenic protein* (BMP) yang berperan dalam remodeling tulang. Dari 20 jumlah BMP, beberapa penelitian mengindikasikan BMP-2 dan BMP-4 dapat meningkatkan regenerasi jaringan tulang yang mengalami cedera, seperti pada pencabutan gigi atau defek berukuran kecil. BMP diketahui membantu pembentukan preosteoblas dari stem sel mesenkim atau sel stroma<sup>30</sup>.

Molekular doking memberikan kesempatan untuk mengamati komponen senyawa dan mendapatkan molekul baru yang terkandung dalam bahan yang dapat berinisiasi dengan sel jaringan<sup>31</sup>. Tidak hanya mengamati, tetapi juga mampu mengganti struktur komponen bahan untuk meningkatkan penetrasi bahan ke membran sel dan juga simulasi penambahan bahan yang dapat meningkatkan penetrasi yang lebih baik<sup>25</sup>.

Melalui pendekatan *in silico* ini, penggunaan biomaterial mikroalga khususnya *C. vulgaris* belum pernah dilakukan sebelumnya. Penelitian ini bertujuan untuk melihat ikatan molekul antara senyawa protein *C. vulgaris* dan sel tulang yang menjadi biomarker osseointegrasi sehingga dapat mempercepat regenerasi tulang disekitar permukaan implan setelah penambahan ekstrak *C. vulgaris*. Diharapkan pemasangan suprastruktur implan juga dapat dilakukan lebih awal serta mampu mendukung penelitian *in vivo* yang telah ada sebelumnya terkait remodeling tulang dan regenerasi jaringan lunak setelah penggunaan ekstrak gel *C. vulgaris*. Selain itu, penelitian *in vitro* untuk pengujian sitotoksik bahan ekstrak *C. vulgaris* dilakukan untuk melihat biokompatibilitas terhadap jaringan tubuh, sehingga dapat

mendukung penelitian sebelumnya. Pendekatan molekular doking ini kedepannya juga diharapkan mampu digunakan untuk biomaterial lain yang berguna dalam pengembangan bahan biomaterial di bidang kedokteran gigi khususnya bidang prostodonsia, dikarenakan efisiensi waktu pengamatan yang maksimal dan biaya penelitian yang minimal.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas maka dapat dirumuskan permasalahan:

1. Apakah komponen aktif ekstrak *C. vulgaris* dapat berikatan dengan lima biomarker osteogenik yang mempengaruhi proses osseointegrasi?
2. Apakah senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik osteopontin melalui pendekatan molekular doking?
3. Apakah senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik osteokalsin melalui pendekatan molekular doking?
4. Apakah senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik BMP-4 melalui pendekatan molekular doking?
5. Apakah senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik BMP-2 melalui pendekatan molekular doking?

6. Apakah senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik RUNX2 melalui pendekatan molekular doking?

### **1.3. Tujuan Penelitian**

Berdasarkan rumusan masalah di atas maka tujuan penulisan dari penelitian ini terbagi atas:

#### **1.3.1. Tujuan umum**

Mengetahui senyawa aktif *C. vulgaris* dan menganalisis afinitas ikatan kompleks molekular doking antara senyawa aktif *C. vulgaris* dan lima biomarker osteogenik yang mempengaruhi osseointegrasi.

#### **1.3.2. Tujuan khusus**

Berdasarkan tujuan umum yang telah diuraikan di atas maka dapat dirumuskan tujuan khusus penelitian ini adalah:

1. Mengetahui dan menganalisis komponen aktif ekstrak *C. vulgaris* yang dapat berikatan dengan lima biomarker osteogenik yang mempengaruhi proses osseointegrasi?
2. Menganalisis senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik osteopontin melalui pendekatan molekular doking?
3. Menganalisis senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik osteokalsin melalui pendekatan molekular doking?

4. Menganalisis senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik BMP-4 melalui pendekatan molekular doking?
5. Menganalisis senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik BMP-2 melalui pendekatan molekular doking?
6. Menganalisis senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik RUNX2 melalui pendekatan molekular doking?

#### **1.4. Manfaat Penelitian**

Berdasarkan tujuan penelitian di atas maka diharapkan penelitian ini dapat memberi manfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan dan bidang kedokteran gigi (khususnya bidang prostodonsia).

##### **1.4.1. Manfaat untuk ilmu pengetahuan**

1. Memberikan informasi yang lebih akurat tentang interaksi biomaterial khususnya mikroalga *C. vulgaris* dan fungsinya dalam membantu proses regenerasi tulang disekitar implan.
2. Memberikan informasi yang lebih akurat terkait efek sitotoksisitas ekstrak *C. vulgaris*.
3. Memperkenalkan penggunaan metode molekular doking untuk membantu validasi penelitian evaluasi biologis in vitro dan in vivo, dan melakukan modifikasi kombinasi biomaterial lainnya.

#### **1.4.2. Manfaat untuk bidang kedokteran gigi**

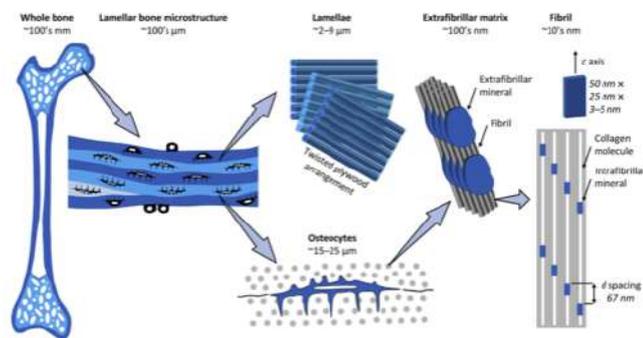
1. Menambah validasi komponen aktif ekstrak *C. vulgaris* yang berperan dalam membantu mempercepat proses penyembuhan tulang dan luka setelah implantasi.
2. Menambah wawasan terkait metode molekular doking yang dapat digunakan sebagai alternatif penelitian yang efisien dan cepat untuk mengetahui dinamika dan fungsi biomaterial lainnya dalam perawatan di bidang prostodonsia.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tulang

Tulang adalah jaringan ikat khusus yang dimineralisasi dengan kalsium fosfat dalam bentuk hidroksiapatit ( $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2] \text{Ca}(\text{OH})_2$ ). Tulang memiliki fungsi mekanis yaitu tulang memberikan kekakuan dan bentuk, perlindungan dan dukungan untuk struktur tubuh, dan membantu pergerakan. Tulang adalah struktur yang sangat dinamis yang mengalami remodeling terus-menerus<sup>32</sup>.



**Gambar 2.1.** Struktur tulang<sup>10</sup>.

Tulang terdiri dari lapisan luar tulang kortikal yang berada di atas tulang trabekular dan rongga medula. Periosteum memiliki dua lapisan yaitu lapisan fibrosa luar dan dalam, yang memiliki potensi osteogenik dan meletakkan tulang baru yang memungkinkan tulang membesar, suatu proses yang dikenal sebagai aposisi periosteal. Permukaan bagian dalam korteks memiliki lapisan lain yang disebut endosteum. Baik periosteum maupun endosteum mengandung osteoblas dan osteoklas serta progenitornya. Osteoblas dan osteoklas berfungsi secara terkoordinasi, melalui aktivitas pembentukan dan penyerapan kembali tulang untuk melakukan remodelling, pertumbuhan, dan perbaikan<sup>32</sup>.

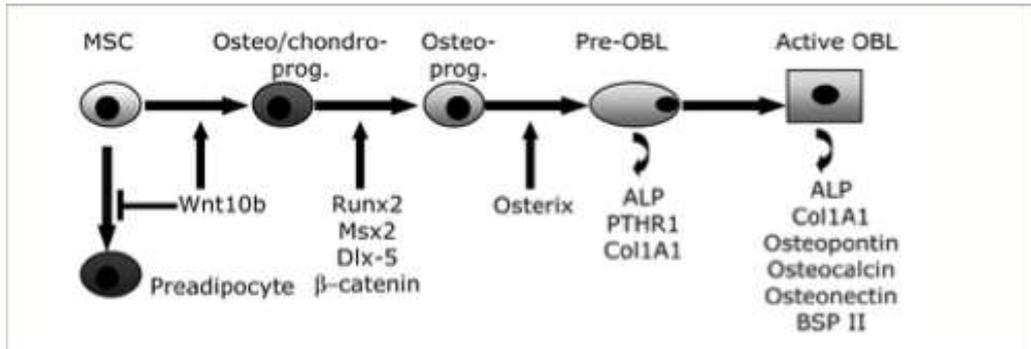
### 2.1.1. Sel-sel tulang

Unit multiseluler dasar tulang terdiri dari osteosit, osteoklas dan osteoblas. Aktivitas unit ini diatur oleh kekuatan mekanis, pergantian sel tulang, hormon (misalnya *parathyroid hormone* (PTH), *growth hormone* (GH)), sitokin, dan faktor lokal<sup>32</sup>.

#### 1. Osteoblas

Osteoblas berasal dari sel punca mesenkim dan mensintesis matriks tulang baru.<sup>33</sup> Fungsi utama osteoblas adalah untuk mensintesis protein dari matriks tulang dan untuk membantu proses kalsifikasi. Peran penting osteoblas dalam biologi osteoklas adalah dengan mengekspresikan dan atau mensekresi molekul kunci yang pada gilirannya mengatur osteoklastogenesis dan resorpsi tulang<sup>34</sup>.

Prinsip mekanisme regulasi utama yang berperan dalam diferensiasi osteoblas meliputi *fibroblast growth factor* (FGF) dan *bone morphogenic protein* (BMP) serta alur pensinyalan Wnt. Sejalan dengan itu, dua faktor transkripsi penting yaitu  *runt-related transcription factor 2* (RUNX2) dan faktor transkripsi spesifik osteoblas (*osterix* atau OSX), diekspresikan dalam osteoblas, yang keduanya sangat penting dan cukup untuk diferensiasi osteoblas<sup>34,35</sup>. Osteoblas muncul dari sel punca mesenkim atau *mesencymal stem cell* (MSC) di bawah rangsangan yang tepat dan akan menuju ke arah progenitor osteoblas atau kondroblas, diikuti oleh sel osteoprogenitor, pra-osteoblas (pra-OBL) yang mengekspresikan alkali fosfatase (ALP) sehingga osteoblas aktif dan matang akan mensekresikan protein matriks tulang<sup>34</sup>.



**Gambar 2.2.** Skematik proses osteoblastogenesis <sup>34</sup>.

## 2. Osteosit

Osteosit adalah sel yang sangat penting dalam pengaturan massa dan struktur tulang bersama dengan osteoblas dan osteoklas. Osteosit adalah osteoblas yang terdiferensiasi secara terminal dengan fungsi utama untuk mendukung struktur tulang dan mekanosensasi, memiliki aktivitas pembentukan tulang yang jauh lebih rendah daripada osteoblas, tetapi merupakan lebih dari 90-95% sel tulang dewasa. Sel ini bertindak sebagai pengatur remodeling tulang dengan memodulasi aktivitas osteoklas dan osteoblas. Sel-sel berbentuk stellata ini terletak di dalam lakuna yang dikelilingi oleh matriks tulang termineralisasi dan hadir dengan koneksi melalui perpanjangan sitoplasma dengan sel-sel pelapis tulang permukaan dan juga dengan sumsum tulang <sup>32,34</sup>.

Osteosit mempertahankan peran penting selama pembentukan dan resorpsi tulang dan merupakan sumber utama *receptor activator of nuclear factor-κB ligand* (RANKL) dalam tulang, yang diperlukan untuk diferensiasi dan fungsi osteoklas. Osteosit juga berfungsi melalui jalur pensinyalan Wnt dan mengatur proliferasi, diferensiasi, dan kelangsungan hidup osteoblas. Wnt juga disarankan untuk terlibat dalam induksi pembentukan tulang bahkan pada kasus-kasus di mana enkapsulasi berserat mendominasi <sup>33</sup>.

Matriks tulang mengisolasi osteosit satu sama lain dan sebagai gantinya, osteosit berinteraksi dengan osteosit lain dan sel tulang melalui jaringan proses osteosit (dendritik) yang rumit, yang berjalan di dalam kanalikuli lakunar. Proses ini berlangsung untuk merangsang resorpsi tulang. Osteosit juga bertindak sebagai sel mekanosensorik dan lacuno-canaliculae membawa molekul sinyal yang bertanggung jawab untuk mempertahankan struktur dan massa tulang<sup>32</sup>.

Selama pembentukan tulang, subpopulasi osteoblas mengalami diferensiasi terminal dan ditelan oleh osteoid yang tidak termineralisasi, di mana mereka disebut sebagai osteoid-osteosit. Setelah mineralisasi matriks tulang, sel-sel yang terkubur ini disebut osteosit dan membentuk jaringan yang membentang di seluruh tulang yang termineralisasi. Osteosit berada di dalam rongga berisi cairan (lakuna) di dalam tulang yang termineralisasi dan jumlahnya sangat melimpah. Osteosit memiliki proses seperti dendrit yang panjang yang meluas ke seluruh kanalikuli (terowongan) di dalam matriks termineralisasi. Proses seperti dendrit ini berinteraksi dengan osteosit lain di dalam tulang yang termineralisasi dan juga berinteraksi dengan osteoblas pada permukaan tulang<sup>36</sup>.

Osteosit berinteraksi dengan osteoblast dengan cara parakrin. Kemampuan osteosit untuk memodulasi fungsi osteoblas dikaitkan dengan sintesis penghambat pembentukan tulang. Sebagai hasil dari interaksi ini, laju pembentukan tulang melambat. Osteosit juga dapat mempengaruhi osteoblas melalui sekresi prostaglandin E2 (PGE2), oksida nitrat (NO), dan ATP, yang menstimulasi aktivitasnya<sup>37</sup>.

### 3. Osteoklas

Osteoklas adalah sel multinukleat yang terdiferensiasi secara terminal dari garis keturunan monosit-makrofag dan di luar perannya dalam resorpsi tulang, sel-sel ini juga merupakan sumber sitokin yang berperan penting dalam homeostasis tulang<sup>33</sup>. Berawal dari sel punca hematopoietik totipoten, faktor transkripsi PU.1, bersama dengan faktor perangsang koloni makrofag (M-CSF) mendorong keterlibatan progenitor umum untuk makrofag dan osteoklas<sup>34</sup>.

Peristiwa awal dari aktivitas osteoklas adalah mendegradasi komponen anorganik dari matriks tulang, yaitu garam alkali dari mineral tulang hidroksiapatit. Hal ini dapat diperoleh dengan pelepasan proton ke area yang akan diserap kembali, yang disebut dengan resorpsi lakuna. Selain itu, fungsi ini juga membutuhkan penyegelan matriks tulang yang diperoleh melalui penataan ulang sitoskeletal dan pembentukan cincin aktin selanjutnya. Kondisi ini adalah struktur melingkar yang mengelilingi membran acak dan mengisolasi lingkungan mikro yang diasamkan dari ruang ekstraseluler. Struktur ini dibentuk oleh beberapa struktur dinamis dan seperti titik yang disebut podosom, masing-masing terdiri dari inti aktin yang dikelilingi oleh integrin  $\alpha\beta3$  dan protein sitoskeletal terkait seperti vinculin,  $\alpha$ -aktinin, dan talin<sup>34</sup>.

Adapun regulasi pada osteoklas yang meliputi RANKL, regulasi oleh osteoblas, regulasi oleh sistem imun, dan sitokin inflamatori dan osteoclastogenesis. Setelah berdiferensiasi, osteoklas multinukleat perlu melekat pada matriks tulang dan berpolarisasi untuk menyerap tulang. Dua domain utama dapat diidentifikasi pada membran plasma osteoklas yaitu domain basolateral dan apikal, yang juga berbeda fungsinya. Pada domain apikal, dimungkinkan untuk mengidentifikasi spesialisasi

membran lebih lanjut, yaitu perbatasan acak, yang ditandai dengan beberapa lipatan membran dan mewakili organ penyerap. Osteoklastogenesis sangat bergantung pada dua sitokin utama, yaitu RANKL, yang juga dikenal sebagai TRANCE (TNF-related activation-inducing cytokine) dan M-CSF (monocyte-colony stimulation factor). M-CSF dianggap penting untuk proliferasi progenitor osteoklas, sementara RANKL secara langsung mengontrol proses diferensiasi dengan mengaktifkan RANK (aktivator reseptor faktor nuklir-kB) <sup>34</sup>.

### **2.1.2. Remodeling tulang**

Tulang terus menerus diganti untuk mempertahankan kekuatan dan integritasnya. Remodeling tulang diatur oleh dua aktivitas yang saling bertentangan, yaitu pembentukan tulang oleh osteoblas, yang menghasilkan matriks tulang organik, dan resorpsi tulang oleh osteoklas, yang melarutkan mineral tulang dan matriks ekstraseluler. Osteogenesis dan angiogenesis adalah dua proses yang terkait erat yang terlibat dalam pertumbuhan, remodeling, dan perbaikan tulang. Osteoklas mengaktifkan angiogenesis secara *in vitro* melalui ekspresi faktor proangiogenik, termasuk vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). Selain itu, VEGF bekerja dengan *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL) untuk mendorong osteoklastogenesis. Osteoklas dapat meningkatkan angiogenesis dan penghambatan aktivitas osteoklas dengan osteoprotegerin (OPG) menurunkan angiogenesis, dan peningkatan aktivitas osteoklas dengan parathormon (PTH) meningkatkan angiogenesis <sup>35</sup>.

Remodeling tulang dimulai ketika input yang berbeda menyebabkan aktivasi lapisan sel, yang meningkatkan ekspresi permukaan RANKL. RANKL berinteraksi dengan reseptornya RANK sehingga memicu diferensiasi osteoklas (fase aktivasi).

Osteoklas meresorpsi tulang (fase resorpsi) sehingga memungkinkan pelepasan faktor-faktor yang biasanya disimpan dalam matriks tulang (BMP, TGF $\beta$ , FGF) yang merekrut osteoblas di area yang diserap kembali. Setelah direkrut, osteoblas menghasilkan matriks tulang baru, dan mendorong mineralisasi (fase pembentukan), sehingga menyelesaikan proses remodeling tulang<sup>34</sup>.

#### **2.1.2.1 Sel-sel lain yang berperan dalam remodeling tulang**

##### **1. Sel Imun Terlibat dalam Remodeling Tulang Fisiologis.**

Terlepas dari lokalisasi anatomis yang dekat antara tulang dengan sumsum tulang, komunikasi silang yang dinamis antara sistem tulang dan sistem imun masih kurang dipahami dan kurang mendapat perhatian<sup>36</sup>.

##### **2. Sel-T dan sel-B.**

Limfosit-T dan limfosit-B merupakan komponen utama dari sistem imun adaptif yang memfasilitasi pengenalan dan penghancuran patogen. Secara mekanis, sel B yang matang menghasilkan sekitar 50% dari total OPG yang berasal dari sumsum tulang, yang akan memberikan kontribusi secara signifikan dalam menahan osteoklastogenesis selama fisiologi normal. Namun, peran sel T dalam mengatur remodeling tulang selama homeostasis masih kurang jelas dan hanya ada sedikit sel T yang teraktivasi di sumsum tulang dalam kondisi basal<sup>36</sup>.

##### **3. Megakariosit.**

Diturunkan dari sel punca hematopoietik, megakariosit berada di dalam sumsum tulang dan menghasilkan trombosit (dikenal sebagai platelet) yang penting untuk pembekuan darah normal. Secara *in vitro*, megakariosit meningkatkan proliferasi dan diferensiasi osteoblas, mengekspresikan RANKL dan OPG, dan mengeluarkan faktor antiosteoklastik. Hal ini menunjukkan bahwa megakariosit

memiliki potensi untuk mengarahkan resorpsi dan pembentukan lengan remodeling tulang<sup>36</sup>.

#### 4. Osteomak

Merupakan makrofag jaringan yang menetap pada atau di dalam tiga sel permukaan endosteal dan periosteal. Makrofag jaringan menyusun sekitar 10-15% dari sebagian besar jaringan dan penting untuk perkembangan jaringan, homeostasis, dan perbaikan. Pada tulang manusia, osteomak dapat diidentifikasi dengan ekspresi penanda mieloid CD68, morfologi bintang yang khas, dan lokasinya yang dekat dengan permukaan tulang. Secara *in vitro*, osteomak diperlukan untuk diferensiasi fungsional penuh, termasuk mineralisasi, osteoblas. Secara *in vivo*, osteomak membentuk lapisan di atas matriks matang yang memproduksi osteoblas di lokasi pemodelan tulang, Penipisan makrofag secara *in vivo* mengakibatkan hilangnya osteomak endosteal dan osteoblas yang terkait, menunjukkan bahwa osteomak diperlukan untuk mempertahankan osteoblas yang matang<sup>36</sup>.

#### **2.1.2.2 Remodeling tulang didapatkan melalui fase berikut<sup>34</sup>:**

##### 1. Aktivasi

Tahap pertama dari remodeling tulang melibatkan deteksi sinyal remodeling awal, yang terjadi pada ujung tombak BMU, Sinyal ini dapat berupa beberapa bentuk, misalnya tekanan mekanis langsung pada tulang yang mengakibatkan kerusakan struktural atau pengaruh hormon (misalnya estrogen atau PTH) pada sel tulang sebagai respons terhadap perubahan homeostasis yang lebih sistemik<sup>36</sup>.

Aktivitas yang dilakukan setiap hari menimbulkan tekanan mekanis yang terus menerus pada tulang, dan diperkirakan bahwa osteosit merasakan perubahan pada

kekuatan fisik ini dan menerjemahkannya ke dalam sinyal biologis yang menginisiasi renovasi tulang<sup>34</sup>. Jaringan kanalikular ini merespons beban, atau penurunan sinyal mekanis, dengan peningkatan protein sclerostin dan RANKL yang mengontrol remodeling tulang di berbagai tingkatan. Proses osteositik yang panjang mampu meneruskan informasi antara sel-sel yang dipisahkan oleh jaringan keras<sup>38</sup>.

Kerusakan matriks tulang atau immobilisasi ekstremitas menyebabkan apoptosis osteosit dan peningkatan osteoklastogenesis. Di bawah kondisi basal, osteosit mengeluarkan *transforming growth factor-B* (TGF-B), yang menghambat osteoklastogenesis. Apoptosis osteosit fokal menurunkan kadar TGF-B lokal, menghilangkan sinyal osteoklastogenesis yang menghambat dan memungkinkan pembentukan osteoblas berlanjut<sup>34</sup>.

Hormon kalsiotropik PTH adalah sinyal remodeling endokrin yang dihasilkan untuk mempertahankan homeostasis kalsium. PTH disekresikan oleh kelenjar paratiroid sebagai respons terhadap berkurangnya kalsium serum dan bekerja secara perifer pada ginjal dan tulang dan secara tidak langsung pada usus untuk mempertahankan homeostasis kalsium serum. Dalam lingkungan mikro tulang, PTH mengaktifkan reseptor G-protein yang berpasangan dengan tujuh transmembran, reseptor PTH, pada permukaan sel osteoblas. Pengikatan PTH pada reseptornya mengaktifkan protein kinase A, protein kinase C, dan jalur pensinyalan intraseluler kalsium pada sel-sel ini dan menginduksi gelombang respons transkripsi yang menghasilkan sekresi molekul yang merekrut prekursor osteoklas, menginduksi diferensiasi dan aktivasi osteoklas, serta membentuk resorpsi tulang<sup>36</sup>.

## 2. Resorpsi

Pada fase ini, pembentukan dan aktivitas osteoklas dikendalikan oleh sel-sel dari garis keturunan osteoblas yang merekrut prekursor osteoklas ke tempat remodeling dengan ekspresi sitokin osteoklastogenesis utama, CSF-1, RANKL, dan OPG, yang juga dimodulasi sebagai respons terhadap PTH<sup>38</sup>. Osteoblas merespons sinyal yang dihasilkan oleh osteosit atau sinyal aktivasi endokrin langsung. Sebagai respons terhadap remodeling tulang yang diinduksi PTH, osteoblas menghasilkan kemokin MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) yang merupakan kemoatraktan untuk prekursor osteoklas dan meningkatkan osteoklastogenesis yang diinduksi oleh RANKL secara *in vitro*. Selain perekrutan prekursor osteoklas, ekspresi osteoblas dari sitokin osteoklastogenesis utama, CSF-1, RANKL, dan OPG, juga dimodulasi sebagai respons terhadap PTH. Ekspresi OPG berkurang, dan produksi CSF-1 dan RANKL meningkat untuk meningkatkan pembentukan osteoklas dan aktivitas selanjutnya. RANKL juga meningkatkan proliferasi prekursor osteoklas dan juga mengkoordinasikan perbedaan prekursor osteoklas menjadi osteoklas berinti banyak, meningkatkan aktivitas resorpsi, dan memperpanjang usia sel dewasa<sup>36</sup>.

Remodeling diprakarsai oleh resorpsi osteoklastik, yang mengikis kekosongan resorpsi, mereka menempel pada permukaan tulang, menyegel kompartemen resorpsi yang mereka asamkan dengan mengeluarkan ion H<sup>+</sup>, memfasilitasi pembubaran mineral tulang dan dengan demikian mengekspos matriks organik ke enzim proteolitik yang mendegradasinya, selama resorpsi, matriks tulang dan mineral tulang dicerna. Kedalamannya bervariasi antara 60-40 µm pada individu muda dan tua, dan periode resorpsi memiliki durasi rata-rata 30-40 hari. Pada tulang

kortikal, BMU dilanjutkan dengan kanalisasi osteonal, di mana osteoklas menggali kanal yang diisi ulang oleh osteoblas, sistem Haversian yang terbentuk memiliki lebar 100-200  $\mu\text{m}$  dan dapat mencapai panjang 10 mm; orientasi mereka berada di sepanjang arah pembebanan trabekular utama, sebaliknya, terkikis sebagai alur di sepanjang permukaan tulang dengan kedalaman 60-70  $\mu\text{m}$  <sup>38</sup>.

### 3. Pembalikan (*Reverse*)

Fase ini berlangsung selama kurang lebih 9 hari dan terjadi setelah kedalaman erosi maksimum tercapai. Pada periode pembalikan, osteoklas mengalami apoptosis sementara osteoblas direkrut dan mulai berdiferensiasi. Oleh karena itu fase pembalikan merupakan transisi dari aktivitas osteoklas ke osteoblas. Setelah osteoklas keluar dari lubang resorpsi, sel-sel pelapis tulang memasuki lakuna dan membersihkan bagian bawahnya dari sisa-sisa matriks tulang. Pembersihan ini terbukti menjadi prasyarat untuk pengendapan lapisan pertama protein (kolase) di lubang resorpsi dan membentuk garis semen (glikoprotein) yang membantu menempelkan osteoblas <sup>38</sup>.

Rongga Howship tetap ditutupi dengan matriks kolagen demineralisasi yang tidak tercerna. Sel mononuklear dari garis keturunan yang tidak terdemineralisasi menghilangkan sisa-sisa kolagen ini dan mempersiapkan permukaan tulang untuk formasi tulang yang dimediasi oleh osteoblas berikutnya. Osteomacs kemungkinan besar bertanggung jawab untuk menghilangkan puing-puing matriks selama fase pembalikan. Makrofag dapat menghasilkan osteopontin yang dimasukkan ke dalam jaringan yang termineralisasi. Namun, sel pelapis tulang mesenkim lebih ideal untuk menyimpan matriks kolagen yang terbentuk di sepanjang garis semen yang kaya osteopontin di dalam celah Howship. Peran terakhir dari sel pembalikan

mungkin untuk menerima atau menghasilkan sinyal kopling yang memungkinkan transisi dari resorpsi tulang ke pembentukan tulang di dalam BMU<sup>36,38</sup>.

#### 4. Formasi

Pembentukan tulang oleh osteoblas berlangsung paling lama, dan lebih lambat daripada resorpsi tulang, melibatkan pembentukan tulang baru dan mineralisasi. Molekul penghubung disimpan dalam matriks tulang dan dibebaskan selama resorpsi tulang. TGF- $\beta$  menjadi sinyal kunci untuk perekrutan sel punca mesenkim ke tempat resorpsi tulang dan osteoklas menghasilkan faktor penghubung. Setelah sel punca mesenkim atau progenitor osteoblas awal kembali ke celah resorpsi, terjadi diferensiasi] dan osteoblas yang berkembang biak membentuk lapisan-lapisan sel<sup>34,36,38</sup>.

Beberapa gen yang terkait dengan pembentukan matriks ekstraseluler (kolagen tipe I, fibronektin, dan TGF- $\beta$ ) diekspresikan secara aktif dan kemudian secara bertahap menurun dipertahankan pada tingkat basal yang rendah selama tahap diferensiasi osteoblas berikutnya. Kolagen tipe I adalah komponen organik utama tulang dan akumulasi berkontribusi, sebagian, terhadap penghentian pertumbuhan sel. Ketika proliferasi berhenti, protein yang terkait dengan fenotipe sel tulang terdeteksi, misalnya enzim alkali fosfatase, osteocalcin<sup>34,36,38</sup>.

Matriks tulang terdiri dari kolagen tipe I (88%) dan 10% sisanya terdiri dari sejumlah besar protein non-kolagen (misalnya osteokalsin, osteonektin, sialoprotein tulang, dan berbagai proteoglikan) serta lipid dan glikosaminoglikan yang mewakili 1 - 2 %. Agar tulang dapat mencapai bentuk akhirnya, hidroksiapatit dimasukkan ke dalam osteoid yang baru diendapkan. Matriks ekstraseluler mengalami serangkaian modifikasi dalam komposisi dan organisasi yang

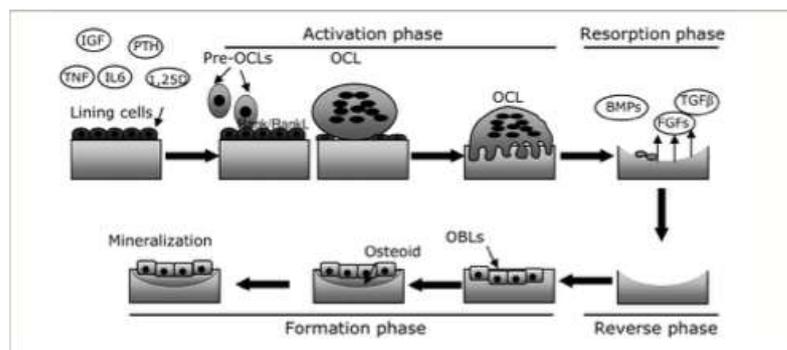
membuatnya kompeten untuk mineralisasi yang dimulai kurang lebih 15 hari setelah osteoid terbentuk, dan protein non-kolagen berpartisipasi dalam proses pematangan matriks, mineralisasi, dan dapat mengatur aktivitas fungsional sel tulang<sup>34,36,38</sup>.

Dimulainya proses mineralisasi, beberapa gen yang diekspresikan tulang lainnya diinduksi ke tingkat maksimal (sialoprotein tulang, osteopontin dan osteocalcin). Komposisi tulang adalah sekitar 10% sel, 60% kristal mineral (kristal hidroksiapatit), dan 30% matriks organik. Ketika jumlah yang sama dari tulang yang diserap telah digantikan, siklus remodeling berakhir. Setelah direkrut, osteoblas menghasilkan matriks tulang baru, yang awalnya tidak mengalami kalsifikasi (osteoid) dan kemudian meningkatkan mineralisasi, sehingga menyelesaikan proses remodelling tulang<sup>34,36,38</sup>.

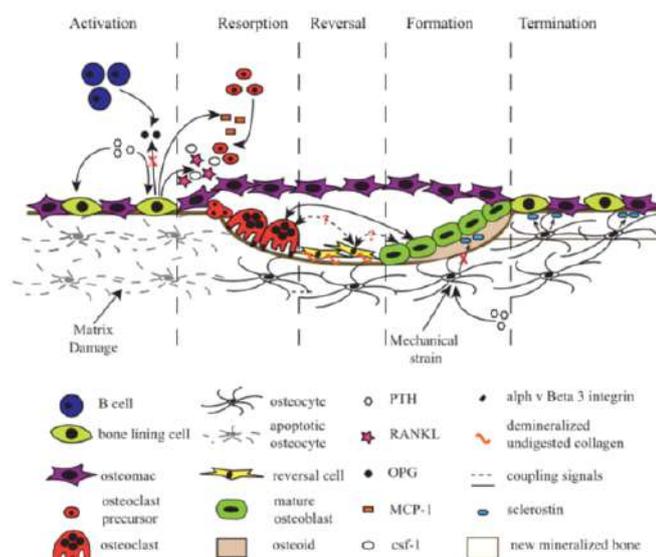
##### 5. Terminasi.

Sinyal terminasi sebagian besar tidak diketahui, dan termasuk diferensiasi akhir osteoblas. Peran osteosit muncul dan sel-sel tersebut kemudian secara bertahap mendatar saat mereka memperlambat produksi, dan akhirnya menjadi sel lapisan yang diam. Beberapa osteoblas berdiferensiasi menjadi osteosit dan tetap berada di dalam matriks. Osteosit dapat mengeluarkan faktor penghambat yang memperlambat laju pembentukan tulang karena rongga yang diserap hampir terisi. Renovasi tulang dimediasi oleh keseimbangan aktivitas sel osteoblas dan osteoklas, yang bersama-sama mempertahankan massa tulang dan homeostasis mineral. Penurunan pembentukan tulang dan peningkatan resorpsi tulang dapat menyebabkan keropos tulang. Oleh karena itu, stimulasi pembentukan tulang dapat menjadi faktor penting lainnya untuk pencegahan dan pengobatan keropos tulang<sup>38</sup>.

Sinyal penghentian yang menginformasikan mesin remodeling untuk berhenti bekerja sebagian besar tidak diketahui, meskipun peran osteosit muncul. Hilangnya ekspresi sklerostin, yang terjadi untuk memulai pembentukan tulang osteoblas, kemungkinan besar akan kembali menjelang akhir siklus remodeling. Setelah mineralisasi, osteoblas dewasa mengalami apoptosis, kembali ke fenotipe lapisan tulang atau tertanam dalam matriks mineralisasi, dan berdiferensiasi menjadi osteosit. Lingkungan permukaan tulang yang beristirahat dibangun kembali dan dipertahankan sampai gelombang remodeling berikutnya dimulai <sup>36</sup>.



**Gambar 2.3.** Representasi skematis dari proses remodeling tulang <sup>(11)</sup>.

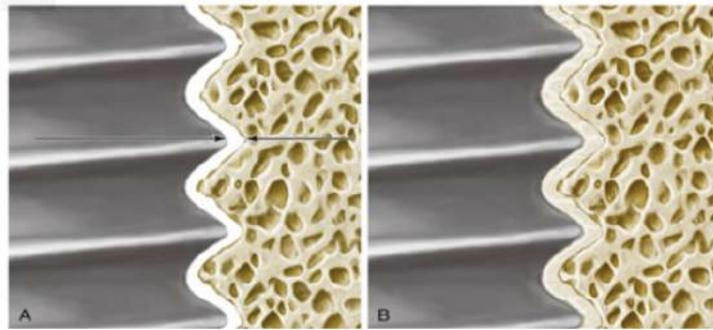


**Gambar 2.4.** Representasi skematis dari BMU dan proses renovasi tulang yang terkait <sup>36</sup>.

### 2.1.3. 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<sup>39</sup>. Menurut Branemark, osseointegrasi adalah hubungan langsung antara tulang hidup dan implan endosseous yang membawa beban pada tingkat mikroskopis cahaya. 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. Dan menurut Glossary Prosthodontic Terms 8, osseointegrasi adalah perlekatan langsung yang jelas atau hubungan jaringan tulang terhadap bahan aloplastik lembam tanpa mengintervensi jaringan ikat<sup>40</sup>.

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. 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<sup>41</sup>.



**Gambar 2.5.** Osseointegrasi dan biointegrasi (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 <sup>41</sup>.

Meffert dkk. membagi lagi osseointegrasi menjadi:

1. Osseointegrasi adaptif yaitu jaringan osseus yang mendekati permukaan implan tanpa antarmuka jaringan lunak yang terlihat pada tingkat mikroskopis cahaya <sup>42</sup>.
2. Biointegrasi adalah perlekatan permukaan tulang biokimia langsung yang dikonfirmasi pada tingkat mikroskopis elektron. Zarb dan T. Albrektsson (1991) mendefinisikannya sebagai proses dimana fiksasi rigid asimtomatik secara klinis dari bahan aloplastik dicapai dan dipertahankan, dalam tulang selama pembebanan fungsional <sup>42</sup>.

### 2.1.3.1 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 <sup>33</sup>.

Adapun fase yang terlibat dalam proses ini adalah fase homeostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling<sup>43</sup>.

#### 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. Sesaat setelah implantasi, permukaan implan berinteraksi dengan molekul air, ion dan protein plasma (albumin, globulin, dan fibrin). Ikatan awal dengan protein terjadi pada albumin, yang selanjutnya digantikan dengan protein konsentrasi lebih rendah namun memiliki afinitas tinggi yaitu fibronectin dan vitronectin. 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<sup>28,44</sup>.

Pada lokasi tersebut, trombosit berkumpul dan membentuk trombus putih untuk menutup kebocoran vaskular dan menghasilkan trombin, ADP, kolagen, fibrinogen, dan trombospondin. Vitronectin yang terdapat pada permukaan logam mengikat trombosit, sehingga menyebabkan trombosit aktif yang kemudian mengaktifkan integrin trombosit  $\alpha\beta3$ . Selanjutnya  $\alpha\beta3$  berinteraksi dengan fibrinogen dan menghubungkan trombosit sehingga terbentuk sumbatan trombosit. Trombosit juga berikatan dengan kolagen dan reseptor glikoprotein spesifik untuk kolagen. Fibrin yang terikat dengan permukaan implan dapat mengikat trombosit melalui reseptor glikoprotein ke permukaan luar implan. Sehingga menghasilkan

aktivasi dan degranulasi trombosit, dan serotonin menghasilkan vasokonstriksi. Pelepasan sitokin dari trombosit yang berdegranulasi menjadi awal fase inflamasi<sup>44</sup>.

## 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- $\beta$ ), 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<sup>42,44</sup>.

Sistem imun bawaan diaktifkan oleh molekul tidak spesifik berasal dari bakteri. Sistem ini meliputi leukosit polimorfonuklear (PMN) dan makrofag. 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 diapadesis. 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. Adesi interselular menarik granulosit keluar dari aliran darah dan berikatan dengan intergrin pada leukosit. Granulosit bermigrasi ke sel endotel, dan PMN yang

menghasilkan elastase dan kolagenase membantu mencerna dan melewati lamina basalis pembuluh darah, dan selanjutnya migrasi diarahkan oleh kemotaksis<sup>44</sup>.

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. 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. 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<sup>44</sup>.

Fase inflamasi awal dalam tiga 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. 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<sup>44</sup>.

### 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. Fibroblas dari jaringan sehat disekitarnya bermigrasi ke

dalam bekuan darah. Bekuan fibrin mengeluarkan matriks metaloproteinase dan degradasi untuk membuka ikatan integrin dalam fragmen<sup>44</sup>.

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. Sel osteoprogenitor menempel pada permukaan luar implan melalui integrin. Integrin menempel pada protein matriks ekstraseluler seperti fibronektin melalui motif RGD<sup>42,44</sup>.

Osteoblas tidak langsung menempel pada logam, tetapi pada lapisan protein di atas implan. Sel prekursor tulang itu sendiri menghasilkan fibronektin seluler yang tidak larut yang diperlukan untuk perlekatan seluler pada titanium. 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. Matriks ekstraseluler dibuat oleh sel-sel ini dan akhirnya terbentuk kalus fibro-kartilaginosa yang berubah menjadi kalus tulang. Tulang awal yang belum matang disebut tulang anyaman<sup>42,44</sup>.

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. Matriks ini kemudian di mineralisasi oleh hidroksiapatit. Proses mineralisasi selama pembentukan tulang primer berlangsung cepat, tetapi relatif tidak terorganisir dan tidak berhubungan erat dengan kolagen<sup>44</sup>.

#### 4. Fase remodeling

Pemegang kunci seluler dari fase remodeling adalah osteoklas yang muncul di luka setelah beberapa hari pasca pembedahan. 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 <sup>44</sup>.

Osteoklas dan osteoblas bekerja secara interdependen. Aksi osteoklas bergantung pada osteoblas yang mengontrol osteoklastogenesis dengan keseimbangan antara RANKL dan rekannya OPG, yang keduanya diproduksi oleh osteoblas. 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<sup>44</sup>.

Osteoprotegerin menjaga tulang dengan menghambat osteoklastogenesis. Rasio RANKL dan osteoprotegerin dapat dimodulasi, dan osteoblas merupakan target untuk berbagai molekul pembawa pesan yang meningkatkan dan menghambat tulang. 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<sup>44</sup>.

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. 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. 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<sup>44</sup>.

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. 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. Pada keadaan akhir, unit yang baru terbentuk, yang mengandung pembuluh darah pusat disebut osteon atau sistem Haversian <sup>44</sup>.

### **2.1.3.2. 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. 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 <sup>45-47</sup>.

OCN atau yang biasa disebut juga Gla adalah asam amino 46-50 yang disekresikan 5,6 kDa yang diproduksi oleh osteoblas. Dalam jumlah yang kecil diproduksi oleh odontoblas gigi dan kondrosit hipertrofik. Protein ini sangat

bergantung pada vitamin K yang kontituennya terlibat dalam koagulasi. 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 <sup>47</sup>.

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). 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  $\beta$ , sekresi insulin, dan kontrol glukosa <sup>46</sup>.

## 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. 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 <sup>48,49</sup>.

Osteopontin berperan penting dalam pembentukan tulang, peradangan, biomineralisasi, penyakit kardiovaskular, kelangsungan hidup sel, kanker, diabetes, dan penyakit batu ginjal melalui mekanisme yang berbeda. Peningkatan adhesi sel tulang dengan berkonsentrasi pada matriks kolagen yang termineralisasi selama pembentukan jaringan tulang<sup>45,50</sup>.

Osteopontin 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  $\alpha\beta3$ . Selain itu, OPN dapat bertindak sebagai pembatas fisik yang membatasi pembentukan kristal pada tulang dan gigi<sup>50</sup>.

### 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. Ekspresi RUNX2 pada fibroblas non-osteoblas cukup untuk menginduksi ekspresi penanda osteoblas seperti kolagen tipe1, sialoprotein tulang, osteocalcin, dan osteopontin. Ekspresi RUNX2 pada progenitor osteokondral menekan diferensiasi kondrosit untuk meningkatkan diferensiasi osteoblas. Sebaliknya, penekanan RUNX2 mencegah diferensiasi sel mesenkim menjadi osteoblas<sup>35</sup>.

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. Namun, ekspresi berlebih RUNX2 juga menyebabkan osteopenia, sehingga mengindikasikan bahwa faktor ini pada tingkat yang tidak tepat dapat menghambat proses pematangan osteoblas<sup>34</sup>.

#### 4. Bone morphogenic protein

Bone morphogenic protein (BMP) adalah sitokin ekstraseluler multifungsi yang terlibat dalam banyak rangkaian molekuler dan jalur sinyal<sup>51</sup>. Terdapat 30 Bone morphogenic protein (BMP) yang membentuk kelompok terbesar dari superfamili TGF (transforming growth factor)- $\beta$ . Dinamakan demikian karena sifat osteoinduktifnya, dan mengatur diferensiasi sel mesenkim menjadi komponen tulang, tulang rawan, atau jaringan adiposa<sup>32</sup>. Di dalam tulang, beberapa ligan BMP disintesis dan disekresikan oleh osteoblas, kondrosit, dan progenitornya. Makrofag yang menyerang dan sel endotel vaskular juga diketahui mengeluarkan BMP selama penyembuhan tulang<sup>52</sup>.

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. Beberapa BMP yang merangsang diferensiasi osteoblas pada MSC secara *in vitro* dan *in vivo* adalah BMP2, BMP6, BMP7, dan BMP4. BMP2 dan BMP7. 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<sup>35</sup>.

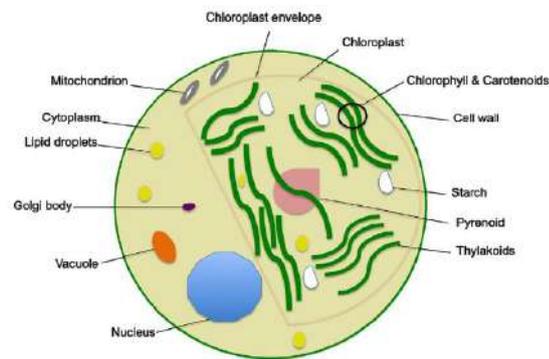
Pensinyalan BMP kanonik dan non-kanonik mendorong pembentukan aktivitas osteoklas dan membantu diferensiasi dan aktivasi osteoklas secara langsung melalui sistem RANK, RANKL, dan atau OPG<sup>51</sup>. Selain itu, pensinyalan BMP dimediasi oleh pengikatan dimer ligan ke kompleks reseptor heteromer. Lingkungan 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<sup>52</sup>.

Alur pensinyalan BMP melalui aktivasi protein Smad heterodimerik mengatur ekspresi RUNX2. Protein Smad adalah molekul pensinyalan intraseluler yang diaktifkan oleh ligan keluarga super TGF- $\beta$  dan dikenali dalam tulang rawan lempeng pertumbuhan. Smad6 tampaknya berperan dalam memblokir pensinyalan BMP, sedangkan Smad7 memblokir TGF- $\beta$  dan BMP, dan Smad7 terlibat dalam menghambat pensinyalan yang bergantung pada TGF- $\beta$ . Smad6 diperlukan untuk menghambat pengerasan endokondral. Hilangnya Smad6 menghasilkan peningkatan aktivitas kondrosit proliferasif dan hipertrofik dan dikaitkan dengan peningkatan produksi kolagen<sup>35</sup>.

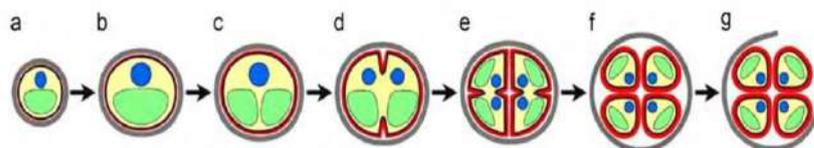
## **2.2. *Chlorella vulgaris***

*Chlorella vulgaris* merupakan mikroalga hijau jenis klorofita yang memiliki bentuk sel bulat, bulat lonjong dengan garis tengah sel antara 2 - 8  $\mu\text{m}$ . Pada umumnya alga hijau memiliki biopigmen yang digunakan untuk berfotosintesis

yaitu klorofil disamping adanya biopigmen karotenoid (karoten dan xantofil). Alga hijau didominasi warna hijau karena berasal dari pigmen klorofil a dan klorofil b. *C. vulgaris* berkembang biak dengan cara membelah diri dan pembentukan spora 53,54.



**Gambar 2.6.** Struktur *Chlorella vulgaris* <sup>53</sup>.



**Gambar 2.7.** Pembentukan sel *Chlorella vulgaris* <sup>53</sup>.

Pertumbuhan metabolisme *C. 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* dan *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 *C. vulgaris*.

Pengolahan microalgae dengan *close system* menggunakan beberapa tipe foto bioreactor seperti tubular, airlift, bubble coloum dan photobioreactor<sup>53</sup>.

### **2.2.1. Kandungan utama *C. vulgaris***

#### **1. Protein**

Protein adalah komposisi yang paling penting dalam ikatan kimia dan komposisi dari mikroalgae. Protein sendiri memiliki peran penting dalam pertumbuhan, perbaikan dan pemeliharaan sel. Total protein dalam *C. vulgaris* 42-58% dalam berat biomassa kering dan bervariasi sesuai dengan kondisi pertumbuhan<sup>53,55</sup>.

Protein juga memiliki banyak peran dan hampir 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. Protein memiliki banyak peran dan hampir 20% dari total protein terikat dalam dinding sel, 50% berada dalam dinding sel dan 30% bergerak dalam dan keluar sel<sup>53,55</sup>.

#### **2. Lemak**

Pada saat kondisi pertumbuhan yang optimal *C. vulgaris* dapat mencapai 5-40% lemak per berat biomassa kering dan terutama terdiri dari glikolipid, wax, hidrokarbon, phospholipid, dan sedikit asam lemak bebas. Kloroplast bertugas dalam mensintesis komponen tersebut dan berada pada dinding sel dan membran dari organel (kloroplas dan membrane mitokondria)<sup>53</sup>.

### 3. Karbohidrat

Karbohidrat mewakili sekelompok gula dan polisakarida seperti pati dan selulosa. komposisi sugar pada dinding sel adalah campuran dari rhamnose, galaktose, glukosa, xylose, arabinose dan mannose. Rhamnose menjadi gula yang dominan. Pati merupakan polisakarida yang paling banyak pada *C. vulgaris* dan biasanya terletak di kloroplast. Selulosa adalah polisakarida struktural dengan resistensi tinggi dan berada pada dinding sel *C. vulgaris* sebagai barrier fibrosa protektif<sup>53</sup>.

### 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<sup>53</sup>.

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<sup>55,56</sup>.

#### 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  $\beta,\beta$ -karotena dan  $\beta,\epsilon$ -karotena. Produk metabolit yang umum diketahui dari beta karotena ini adalah vitamin A<sup>53</sup>.

#### 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<sup>53,57</sup>.

#### 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) <sup>53,55</sup>.

### **2.2.2. 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 <sup>58</sup>.

#### **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 <sup>58</sup>.

#### **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 <sup>58</sup>.

#### **3. Senyawa fenol**

Senyawa fenol dapat mengatur kadar gula darah, sebagai antikanker, antioksidan, antimikroba, dan antiinflamasi. 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 <sup>58</sup>.

#### 4. Terpenoid

Beberapa hasil penelitian menunjukkan senyawa terpenoid, yaitu 17 monoterpenoid linalool, diterpenoid, triterpenoid saponin, dan triterpenoid glikosida, memiliki aktifitas sebagai antibakteri (Gunawan et al., 2008). Selain itu, terpenoid juga bermanfaat menurunkan aktifitas inflamasi dari penurunan sintesis prostaglandin dalam tubuh <sup>58</sup>.

#### 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 <sup>58</sup>.

#### 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 <sup>58</sup>.

#### 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

(Scheuer, 1995). Sterol adalah salah satu senyawa lipid yang besar pengaruhnya terhadap proses peradangan dan mencegah terjadi alergi berkepanjangan (Winarti, 2010). Beberapa jenis sterol yang diekstraksi dari *C. vulgaris* mampu menghambat peradangan yang diinduksi dengan zat kimia tertentu pada kulit <sup>58</sup>.

#### 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 <sup>58</sup>.

#### 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 <sup>58</sup>.

#### 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 <sup>58</sup>.

#### 11. Asam lemak

Suatu antibiotik yang dinamai chlorellin didapatkan dari pemotongan asam lemak tak jenuh rantai panjang yang terdapat dalam *Chlorella* <sup>58</sup>.

**Tabel 2.1.** Analisis komponen Chlorella kering per 100 gr

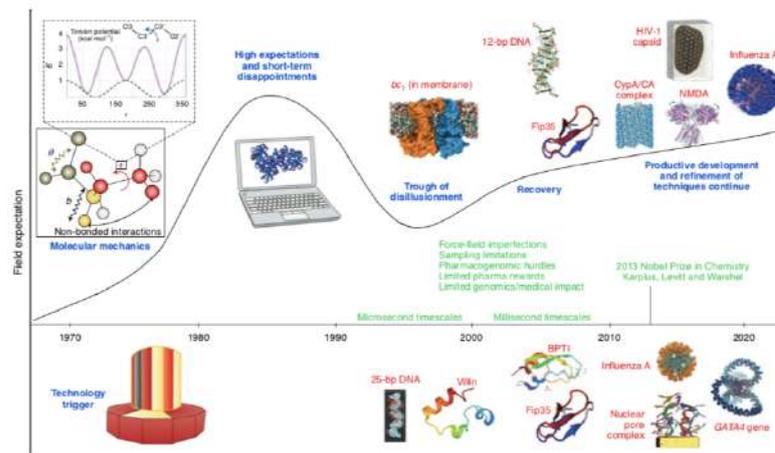
<b>Komponen</b>	<b>Kandungan</b>
Protein	53-66 g
Lemak	6-15 g
Karbohidrat	10-20 g
Klorofil	1500-3000 mg
Karotin	10-80 mg
Zat Besi	80-200 mg
Kalsium	60-160 mg
Magnesium	150-500 mg
Vitamin A	5000-45000 IU.
Vitamin E	11-22 IU.
Vitamin B1	1-3 mg
Vitamin B2	2,5-7 mg
Vitamin B3	15-30 mg
Vitamin B6	0,6-2 mg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

## **2.3. Molekular Doking**

### **2.3.1. Definisi**

Molekular doking merupakan metode berbasis genetika yang dapat digunakan untuk mencari pola interaksi yang paling tepat dan melibatkan antara dua molekul, yaitu reseptor dan ligan. Ligan merupakan molekul sinyal kecil yang terlibat dalam kedua proses anorganik dan biokimia. Doking merupakan metode simulasi untuk mengetahui orientasi antara ligan dengan reseptor<sup>59</sup>.

Proses doking terbagi atas dua jenis, yaitu blind doking dan oriented doking. Blind doking merupakan proses doking yang dilakukan tanpa mengetahui letak sisi aktif dari reseptor dengan tepat, sedangkan oriented doking merupakan proses doking yang dilakukan dengan telah mengetahui letak sisi aktif dari reseptor dengan tepat.



**Gambar 2.8.** Perkembangan biomolekular modeling dan simulasi<sup>23</sup>.

Bidang ini dimulai dengan upaya mekanika molekuler yang komprehensif, dan berkembang pesat dengan meningkatnya ketersediaan workstation yang cepat dan superkomputer. Dalam ilustrasi mekanika molekuler (panel kiri atas), simbol  $b$ ,  $\theta$  dan  $\tau$  masing-masing mewakili gerakan ikatan, sudut dan sudut dihedral, dan interaksi yang tidak berikatan juga ditunjukkan. Potensial torsi ( $E$ ) mengandung suku dua kali lipat (kurva hitam putus-putus) dan tiga kali lipat (kurva ungu solid). Setelah ekspektasi jangka pendek yang terlalu tinggi dan kekecewaan mengenai dampak medis yang terbatas dari pemodelan dan penelitian genomik terhadap pengobatan penyakit manusia, kolaborasi yang lebih baik antara teori dan eksperimen telah mengantarkan bidang ini ke tahap produktif<sup>23</sup>.

Tantangan yang dihadapi dalam dekade 2000-2010 termasuk ketidaksempurnaan medan gaya, keterbatasan pengambilan sampel konformasi, beberapa rintangan farmakogenomik, dan terbatasnya dampak medis dari terapi berbasis genomik untuk penyakit manusia. Inovasi teknologi yang telah membantu mendorong bidang ini termasuk komputasi terdistribusi dan munculnya penggunaan GPU untuk komputasi biomolekuler. Superkomputer khusus dinamika

molekuler, Anton, pada tahun 2009 memungkinkan untuk mencapai skala waktu milidetik untuk simulasi semua atom secara eksplisit-pelarut. Hadiah Nobel Kimia 2013 yang diberikan kepada Levitt, Karplus, dan Warshel membantu memvalidasi bidang yang tertinggal dari eksperimen dan mendorong lintasannya <sup>23</sup>.

Metode berbasis fisika menawarkan kepada kita pemahaman konseptual tentang proses biologis. Medan gaya untuk protein, asam nukleat, membran, dan molekul organik kecil telah diterapkan untuk mempelajari masalah-masalah seperti pelipatan protein, mekanisme enzimatik, pengikatan/pelepasan ikatan ligan, mekanisme penyisipan membran, dan masih banyak lagi <sup>23</sup>.

### **2.3.2. Tujuan**

Molekular doking bertujuan meniru peristiwa interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi targetnya pada uji in-vitro. Molekular doking dapat diklasifikasikan menjadi 3 berdasarkan fleksibilitas molekul yaitu *Rigid Doking* (bersifat rigid/kaku), *semi-flexible doking* (bersifat semi fleksibel) dan *flexible doking* (bersifat fleksibel) <sup>59</sup>. Metode berbasis fisika sangat penting untuk mempelajari dinamika protein dan jalur pelipatan <sup>23</sup>.

Tujuan dari doking adalah untuk mencapai konformasi protein dan ligan yang optimal. Doking membantu dalam mempelajari obat / ligan atau interaksi reseptor / protein dengan mengidentifikasi situs aktif yang cocok pada protein, mendapatkan geometri terbaik dari kompleks ligan – reseptor. Doking menjadi dasar untuk penemuan obat secara simulasi komputasi. Langkah pertama dari desain obat dibantu komputer adalah menemukan situs pengikatan ligan protein, yang merupakan kantong atau celah pada permukaan protein yang digunakan untuk mengikat ligan (obat terlarang) <sup>59</sup>.

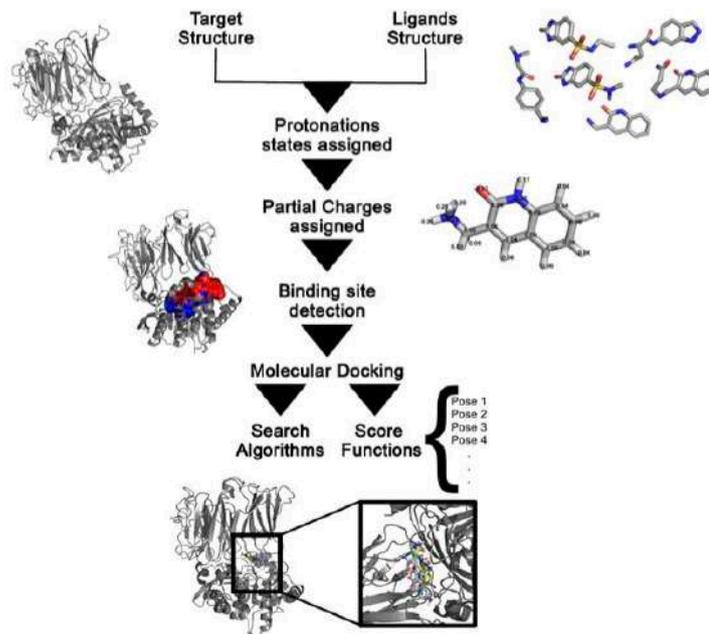
### 2.3.3. Komponen dan prosedur doking

Secara umum, prosedur doking dapat dilakukan sebagai berikut:

#### 1. Pengambilan struktur protein dan ligand

Menemukan protein target dan ligan yang praktis adalah krusial dalam menjalankan proses doking. Oleh karena itu, seseorang harus memeriksa apakah protein target telah tersimpan dalam basis pengetahuan Swiss UniProt (<http://expasy.org/sprot>) atau basis data Protein Data Bank (PDB) (<http://pdb.org>). Pemodelan homologi dapat dilakukan dengan menggunakan repositori Swiss model (<http://swissmodel.expasy.org/repository/>), program-model seperti I-TASSER, dan sebagainya, jika protein target tidak ada dalam basis data tetapi ada urutan yang mirip. Langkah berikutnya adalah menemukan ligan menggunakan basis data PubChem (<http://pubchem.org>), Zinc (<http://blaster.doking.org/zinc/>), ChmBl, atau jika tidak ada ligan dalam basis data tersebut, ChemDraw atau ChemSketch dapat digunakan untuk mensintesis ligan dari awal<sup>24,60</sup>.

Protein Data Bank (PDB) adalah arsip dari data structural makromolekular biologis yang mencakup lebih dari 32.500 struktur. Data tersebut terdiri atas proyek yang menyumbangkan struktur, pengidentifikasi target, nama protein, organisme sumber, status produksi (klon, ekspresi, dan kristalisasi), referensi terkait, serta link untuk proyek terkait. Protein target dapat dicari berdasarkan nama protein, nama pengidentifikasi target, sekuens yang mirip, program, atau organism asal. Hasil yang disimpan dalam format FASTA, .txt, dan .pdb<sup>22</sup>. MarvinSketch merupakan aplikasi menggambar struktur kimia yang dapat menampilkan karakteristik dari struktur tersebut dengan menggunakan menu-menu yang disediakan<sup>23</sup>.



**Gambar 2.9.** Sistem kerja molekular doking <sup>23</sup>.

## 2. Persiapan protein.

Proses pengoptimalan struktur protein dan kesiapan untuk simulasi *C. vulgaris* yang presisi dikenal sebagai persiapan protein, dan ini adalah tahap penting dalam proses *C. vulgaris* molekular. Struktur protein pertama-tama diperoleh dari database seperti Protein Data Bank (PDB) atau dibuat menggunakan alat pemodelan molekular seperti SWISS MODELLER. Struktur tersebut kemudian diselesaikan dengan menambahkan atom atau residu tambahan yang diperlukan<sup>61</sup>.

Protein selanjutnya menjalani minimisasi energi untuk melonggarkan strukturnya dan menghilangkan interferensi sterik. Keadaan protonasi dari residu yang dapat mengion terlebih dahulu ditentukan untuk menyediakan interaksi elektrostatik yang tepat selama *C. vulgaris*. Untuk lebih menyederhanakan sistem, molekul air dan ligan yang tidak diperlukan dihilangkan dari struktur protein. Untuk mencerminkan perilaku protein secara tepat selama simulasi *C. vulgaris*, parameter medan gaya yang sesuai akhirnya diberikan kepadanya. Melalui langkah-langkah

persiapan ini, struktur protein dioptimalkan dan diperhalus, memberikan titik awal yang sesuai untuk studi doking molekuler yang sukses<sup>61</sup>.

### 3. Identifikasi senyawa unggulan atau potensial.

Ligan yang akan didoking dipilih berdasarkan kriteria-kriteria tertentu, seperti keberagaman kimianya, aktivitas biologis yang sudah dikenal, atau potensinya dalam pengembangan obat. Ligan tersebut kemudian dipersiapkan untuk proses doking dengan menetapkan muatan, menghasilkan konformernya, dan mengoptimalkan geometrinya<sup>62</sup>.

### 4. Prediksi situs aktif.

Selama proses doking molekuler, kantong pengikatan dapat ditentukan secara awal atau diidentifikasi setelah proses doking. Oleh karena itu, untuk memvalidasi kantong pengikatan yang diinginkan selama doking molekuler, tiga pendekatan yang berbeda dapat diambil, seperti yang dijelaskan di bawah ini<sup>61,63</sup>.

- Doking berbasis situs: Pertama, identifikasi situs pengikatan protein-ligan dan kemudian lakukan doking dengan ligan.
- Doking buta/*blind*: ligan yang didoking langsung ke dalam struktur reseptor lengkap tanpa pengetahuan sebelumnya tentang situs pengikatan.
- Doking dengan standar: doking protein dengan ligan uji dan/atau molekul kecil standar. Ligan standar membantu dalam memprediksi kantong pengikatan yang relevan.

Selain itu, menghitung konstanta inhibisi untuk ligan dan protein yang didok adalah langkah penting dalam mengevaluasi afinitas pengikatan dan aktivitas penghambatan potensial dari ligan. Namun, hal ini tidak selalu diperlukan atau berlaku dalam semua kasus. Keputusan untuk menghitung konstanta inhibisi

tergantung pada pertanyaan penelitian tertentu, desain eksperimental, dan tujuan studi.

#### 5. Protein-ligan doking.

Ligan didoking terhadap protein dan dilakukan interaksi-analisis. Fungsi skoring memberikan nilai berdasarkan kompleks ligan terbaik yang dipilih. Selama perhitungan doking, strategi yang umum digunakan adalah menggunakan representasi grid yang mencakup energi potensial yang telah dihitung sebelumnya untuk interaksi di dalam situs pengikatan target. Pendekatan ini mempercepat proses doking dan pada dasarnya terdiri dari diskritisasi situs pengikatan<sup>24</sup>.

Energi potensial yang telah dihitung sebelumnya untuk interaksi di dalam situs pengikatan target. Pendekatan ini pada setiap titik kisi, interaksi yang terkait dengan Lennard-Jones dan potensial elektrostatik dihitung. Dua aspek yang sangat penting untuk program doking: algoritme pencarian dan fungsi penilaian. Algoritma pencarian menganalisis dan menghasilkan pose ligan pada situs pengikatan target, dengan mempertimbangkan derajat kebebasan roto-translasi dan internal ligan<sup>24,36</sup>.

#### 6. Analisis pasca-doking.

Setelah ligan telah didok pada protein, hasilnya dianalisis untuk mengidentifikasi calon-calon yang paling menjanjikan untuk penelitian lebih lanjut. Afinitas pengikatan dari masing-masing ligan dihitung berdasarkan energi interaksi yang diprediksi, dan ligand-ligand diurutkan berdasarkan skor afinitas mereka. Struktur hasil doking juga dianalisis untuk mengidentifikasi interaksi kunci antara ligan dan protein, seperti ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan interaksi elektrostatik. Interaksi-interaksi ini dapat memberikan wawasan tentang mekanisme kerja ligan dan membimbing optimasi struktur lebih lanjut<sup>64</sup>.

#### 2.3.4. Penggunaan molekular doking secara umum

Doking molekular sangat umum digunakan dalam proses identifikasi senyawa unggulan dalam penemuan obat. Metode ini membantu mengidentifikasi calon obat potensial dengan memprediksi afinitas pengikatan senyawa kecil terhadap protein atau reseptor yang diinginkan. Doking dapat digunakan untuk menyaring basis data senyawa kecil yang luas guna mengidentifikasi senyawa-senyawa yang dapat berikatan dengan protein yang diinginkan dengan afinitas yang tinggi.

- Optimasi senyawa unggulan.

Setelah senyawa unggulan diidentifikasi, doking molekular dapat digunakan untuk mengoptimalkan struktur senyawa unggulan guna meningkatkan afinitas pengikatan dan selektivitasnya. Doking juga dapat digunakan untuk merancang analog baru dengan memprediksi mode pengikatan struktur yang dimodifikasi<sup>65</sup>.

- Bioremediasi.

Doking molekular digunakan dalam bioremediasi untuk memprediksi afinitas pengikatan senyawa kecil dengan enzim yang terlibat dalam degradasi polutan lingkungan. Doking dapat membantu merancang inhibitor atau aktivator enzim ini untuk meningkatkan efisiensi bioremediasi<sup>66</sup>.

- Prediksi ADMET.

Doking juga dapat digunakan untuk memprediksi sifat-sifat Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas (ADMET) dari senyawa kecil. Sifat-sifat ADMET yang diprediksi dapat digunakan untuk menyaring senyawa-senyawa dengan sifat-sifat yang tidak menguntungkan pada tahap awal proses penemuan obat. Beberapa contoh terkenal termasuk AutoDock Vina, GOLD (Genetic Optimization for Ligand Doking), Glide, dan Schrödinger Suite. Paket

perangkat lunak ini menyediakan algoritma-algoritma canggih dan teknik-teknik komputasi untuk simulasi doking ligand-reseptor yang efisien, memungkinkan prediksi afinitas pengikatan dan identifikasi calon obat potensial. Selain itu, mereka memasukkan modul prediksi ADMET, memungkinkan penilaian perilaku obat dalam hal absorpsi, distribusi di dalam tubuh, metabolisme, ekskresi, dan potensi toksisitas<sup>67</sup>.

- Simulasi dinamika molekuler.

Doking molekuler dapat digabungkan dengan simulasi dinamika molekuler untuk mempelajari perilaku dinamis kompleks protein-ligan. Simulasi ini dapat membantu memahami perubahan konformasi yang terjadi saat pengikatan ligan dan stabilitas kompleks tersebut. Beberapa alat perangkat lunak menggabungkan doking molekuler dan simulasi dinamika. Ini termasuk perangkat lunak yang sering digunakan seperti AutoDock, Vina, Glide, dan GOLD. Selain doking molekuler, mereka memberikan kemampuan untuk melakukan simulasi dinamika molekuler, memungkinkan eksplorasi interaksi protein-ligan sepanjang waktu dan analisis perilaku dinamisnya<sup>68</sup>.

- Penjelasan struktur.

Doking molekuler juga dapat digunakan untuk mengungkapkan struktur protein yang strukturnya belum diketahui. Doking dapat digunakan untuk memprediksi mode pengikatan senyawa kecil dengan protein dan menghasilkan model homologi protein berdasarkan prediksi mode pengikatan. Model yang dihasilkan kemudian dapat diperbaiki menggunakan data eksperimental untuk mendapatkan struktur protein yang akurat<sup>69</sup>.

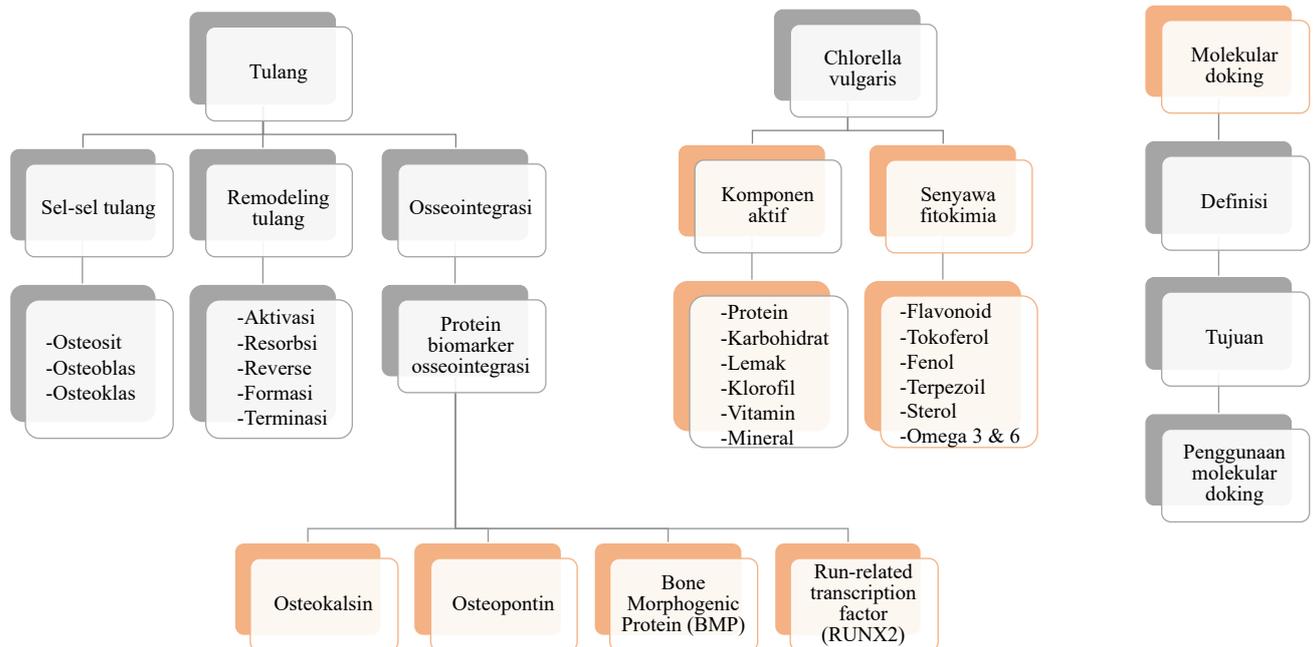
**Tabel 2.2.** Software molekular doking<sup>24</sup>.

Software	Posing	Scoring	Availability
Vina	Iterated Local Search + BFGS Local Optimiser	Empirical/ Knowledge-Based	Free (Apache License)
AutoDock4	Lamarckian Genetic Algorithm, Genetic Algorithm or Simulated Annealing	Semiempirical	Free (GNU License)
Molegro/MoIDock	Differential Evolution (Alternatively Simplex Evolution and Iterated Simplex)	Semiempirical	Commercial
Smina	Monte Carlo stochastic sampling + local optimisation	Empirical (customisable)	Free (GNU License)
Plants	Ant Colony Optimisation	Empirical	Academic License
ICM	Biased Probability Monte Carlo + Local Optimisation	Physics-Based	Commercial
Glide	Systematic search + Optimisation (XP mode also uses anchor-and-grow)	Empirical	Commercial
Surflex	Fragmentation and alignment to idealised molecule (Protomol) + BFGS optimisation	Empirical	Commercial
GOLD	Genetic Algorithm	Physics-based (GoldScore), Empirical (ChemScore, ChemPLP) and Knowledge-based (ASP)	Commercial
GEMDOCK	Generic Evolutionary Algorithm	Empirical (includes pharmacophore potential)	Free (for non-commercial research)
Dock6	Anchor-and-grow incremental construction	Physics-based (several other options)	Academic License
GAsDock	Entropy-based multi-population genetic algorithm	Physics-based	*
FlexX	Fragment-Based Pattern-recognition (Pose Clustering) + Incremental Growth	Empirical	Commercial
Fred	Conformer generation + Systematic rigid body search	Empirical (defaults to Chemgauss3)	Commercial
DockThor	Steady-state genetic algorithm (with Dynamic Modified Restricted Tournament Selection method)	Physics-based + Empirical	Free (Webserver)

## BAB III

### KERANGKA KONSEP, KERANGKA TEORI, HIPOTESIS

#### 3.1. Kerangka Teori



Keterangan:

= Variabel yang diteliti

= Variabel yang tidak diteliti

### 3.2. Kerangka Konsep



### 3.3. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah dan tujuan dari penelitian ini, maka dibuat hipotesis penelitian sebagai berikut:

1. Terdapat beberapa komponen aktif ekstrak *C. vulgaris* yang dapat berikatan dengan lima biomarker osteogenik yang mempengaruhi proses osseointegrasi.
2. Terdapat senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik osteopontin melalui pendekatan molekular doking.
3. Terdapat senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik osteokalsin melalui pendekatan molekular doking.
4. Terdapat senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik BMP-4 melalui pendekatan molekular doking.
5. Terdapat senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik BMP-2 melalui pendekatan molekular doking.
6. Terdapat senyawa aktif dari ekstrak *C. vulgaris* yang memiliki afinitas ikatan tertinggi dengan biomarker osteogenik RUNX2 melalui pendekatan molekular doking.