

PENGARUH APLIKASI TOPIKAL SIMVASTATIN TERHADAP EKSPRESI OSTEOKALSIIN PADA PROSES PENYEMBUHAN TULANG TIKUS MODEL DIABETES MELITUS

Mario Agung Asmara*, Rahardjo**, dan Bambang Dwirahardjo**

*Program Studi Ilmu Bedah Mulut dan Maksilofasial

Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis FKG UGM

**Bagian Bedah Mulut dan Maksilofasial FKG UGM

INTISARI

Latar belakang. Angka penderita diabetes melitus di dunia semakin meningkat setiap tahunnya. Penderita diabetes melitus tidak tertutup kemungkinan bisa terkena jejas pada tulangnya, seperti fraktur atau defek karena desakan dari pertumbuhan suatu tumor. Kondisi diabetes melitus akan menyebabkan komplikasi hampir pada semua organ tubuh manusia. Penyembuhan tulang pada penderita diabetes yang terkena jejas diharapkan dapat mengembalikan morfologi dan fungsional dari tulang tersebut seperti semula. Metabolisme proses penyembuhan tulang dapat dimonitor dengan osteokalsin. Penambahan simvastatin dapat mempercepat proses penyembuhan pada tulang. Statin merupakan inhibitor reduktase koenzim A 3-hidroxy-3-methylglutaril. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian aplikasi topikal simvastatin terhadap ekspresi osteokalsin pada proses penyembuhan tulang tikus model diabetes melitus.

Metode. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan hewan coba 45 ekor tikus jenis SD. Kelompok 1: 15 ekor tikus normal defek tulang femur kiri diberi gel simvastatin dan defek tulang femur kanan kosong. Kelompok 2: 15 ekor tikus DM defek tulang femur kiri diberi gel CMC-Na dan defek tulang femur kanan kosong. Kelompok 3: 15 ekor tikus DM defek tulang femur kanan diberi gel simvastatin. Periode dekapitasi pada hari H+5, H+8 dan H+10 pasca pembuatan defek dan dilakukan pemeriksaan IHC untuk melihat ekspresi osteokalsin.

Hasil. Terdapat peningkatan jumlah persentase ekspresi osteokalsin pada tikus DM dengan gel simvastatin jika dibandingkan dengan tikus DM tanpa gel simvastatin ($p < 0,05$) pada hari H+5, H+8 dan H+10 pasca pembuatan defek.

Kesimpulan. Aplikasi topikal simvastatin pada tulang diabetes melitus dapat meningkatkan jumlah persentase ekspresi osteokalsin selama proses penyembuhan tulang.

Kata kunci: *simvastatin, osteokalsin, penyembuhan tulang, tikus model diabetes melitus*

ABSTRACT

Background. Statics of people with diabetes mellitus throughout the world increases every year. There are possibilities for them to get injuries in the bone. For example are fractures or defects due to the effect of the growth of tumor insistence. Diabetes mellitus condition will cause complications in most of human organs. The healing in diabetes mellitus patient's bone is expected to regain the normal morphology and the function of the bone. Healing metabolism process of the bone can be monitored with osteocalcin. The addition of simvastatin can accelerate the healing process in bones. Statins are coenzyme A reductase inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaril. This study aims to determine the effect of topical application of simvastatin on the expression of osteocalcin in the bone healing process of diabetes mellitus in laboratory rats.

Methods. This study is experimental research with forty five laboratory rats type SD. Group 1: 15 normal rats given a left femur bone defects simvastatin gel and right femur bone defects empty. Group 2: 15 DM rats left femur bone defect were given CMC-Na gel and the right femur bone defects empty. Group 3: 15 DM rats were given the right femur bone defects simvastatingel. Period of decapitation on day 5th, 8th and 10th postmanufacturedefect. IHC examination to see osteocalcin expression.

Results. There is an increase in the percentage of osteocalcin expression in diabetic rats with simvastatin gel when compared with diabetic rats without simvastatin gel ($p < 0.05$) on day 5th, 8th and 10th postmanufacturedefect.

Conclusion. Topical application of simvastatin on bone diabetes mellitus can increase the percentage of osteocalcin expression during the healing process of bones.

Keywords: *simvastatin, osteocalcin, bone healing, diabetes mellitus rat models*

PENDAHULUAN

Penyakit diabetes melitus merupakan suatu penyakit yang mempunyai karakteristik meningkatnya nilai glukosa plasma darah. Kondisi hiperglikemia ini diakibatkan oleh adanya gangguan pada sekresi insulin, aksi insulin atau kedua-duanya. Dekade belakangan ini diabetes

melitus telah menjangkiti sekitar 140 juta orang di dunia. Tahun 2010 kemarin diperkirakan telah menjangkiti sekitar 220 juta orang penduduk dunia.¹ Diabetes melitus dibagi ke dalam dua tipe yaitu: diabetes melitus tipe 1 (diabetes melitus tergantung insulin) dan diabetes melitus tipe 2 (diabetes melitus tidak tergantung insulin).²

Penderita diabetes melitus tidak tertutup kemungkinan terkena jejas pada tulangnya. Jejas tersebut bisa berupa kerusakan tulang seperti fraktur atau defek karena desakan dari pertumbuhan suatu tumor. Penyembuhan tulang pada penderita diabetes yang terkena jejas diharapkan dapat mengembalikan morfologi dan fungsional dari tulang tersebut seperti semula.³ Penyembuhan tulang merupakan suatu proses regenerasi jaringan pada sisi jejas dengan jaringan tulang yang baru dan bukan dengan jaringan parut. Penyembuhan tulang secara garis besar mempunyai empat tahapan yaitu: inflamasi, *soft kalus*, *hard kalus* dan remodeling.⁴

Kondisi diabetes melitus akan menyebabkan komplikasi hampir pada semua organ tubuh manusia. Penderita diabetes melitus memiliki gangguan pada produksi insulin atau insulin tidak mampu mengimbangi kadar gula darah yang tinggi. Insulin mampu merangsang pembentukan matriks osteoblastik pada tulang dan kartilago.^{4,1} Gangguan reparatif tulang terjadi karena berkurangnya produksi *growth factor*, faktor angiogenik, berkurangnya kemampuan proliferasi sel-sel tulang.⁵ Diabetes melitus juga mempengaruhi pembentukan dan fungsi dari osteoblas. Sel-sel osteoblas mampu mengeluarkan osteokalsin yang merupakan *bone matrix protein* sebagai protein spesifik pada formasi pembentukan tulang. Diabetes melitus menyebabkan berkurangnya osteoblas sehingga akan berdampak pada osteokalsin yang juga ditemukan dalam jumlah kecil.^{6,5}

Metabolisme proses penyembuhan tulang dapat dimonitor dengan *bone marker formation*. Salah satu *marker* tulang yang dapat digunakan untuk menilai proses metabolisme tulang adalah osteokalsin. Mayoritas osteokalsin disekresikan oleh osteoblas di matriks ekstraseluler tulang. Osteoblas merupakan sel yang berasal dari mesenkimal stem sel.^{6,7}

Banyak peneliti berusaha menambahkan zat guna mempercepat proses penyembuhan pada tulang, salah satunya adalah simvastatin. Statin merupakan inhibitor *coenzim A 3-hidroxy-3-methylglutaril reductase*. Simvastatin mampu meningkatkan osteoblas dan ekspresi marker tulang, seperti *bone morphogenetic protein* (BMP), osteokalsin, osteopontin dan alkaline fosfatase (ALP). Simvastatin mampu meningkatkan jumlah sel-sel osteoblas dan sel-sel *bone marrow*.⁸

Simvastatin jika diberikan peroral tidak akan diabsorpsi sempurna dan hanya 5% yang

mencapai sirkulasi sistemik. Simvastatin diaplikasikan secara topikal pada tulang yang mengalami defek maka konsentrasi akan meningkat pada lokal area tersebut.^{8,9}

Hewan coba pada penelitian ini menggunakan tikus yang dikondisikan diabetes melitus dengan cara menginduksikan Streptozotisin (STZ). Tiga hari setelah induksi STZ, pankreas menjadi bengkak dan sel β Langerhans mengalami degenerasi sehingga produksi insulin terganggu.¹⁰ Peningkatan kadar gula darah pada tikus model diabetes melitus sangat berarti yaitu rata-rata 200–500 mg/dL, kadar gula darah normal pada tikus antara 80–135 mg/dL.^{11,12}

Tujuan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian aplikasi topikal simvastatin terhadap ekspresi osteokalsin pada proses penyembuhan tulang tikus model diabetes melitus.

METODE PENELITIAN

Gel simvastatin dibuat dengan mencampurkan tablet simvastatin dengan CMC-Na (*carboxy methyl cellulosa - natrium*) 2% sehingga diperoleh konsentrasi simvastatin 2,5% gram w/w. Gel CMC-Na dibuat dengan mencampurkan CMC-Na 2% ke dalam 100 ml air destilasi hangat.

Subyek dalam penelitian ini menggunakan 45 ekor tikus jenis *Sparague Dawley* berumur 3-4 bulan dan berjenis kelamin jantan. Tikus tersebut dibagi dalam 3 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri dari 15 ekor tikus. Penimbangan berat badan dilakukan pada masing-masing tikus untuk mengetahui dosis STZ, ketamin, *xylazine*, antibiotik dan analgesik yang akan diberikan. Sebelum dilakukan tindakan induksi STZ semua tikus diukur GDS-nya dan dipuasakan 6 jam sebelumnya.

Induksi STZ dilakukan dengan dosis 40 mg/kg BB via injeksi intraperitoneal pada kelompok tikus 2 dan 3. Asupan *dextrosa* 5% diberikan untuk menghindari hipoglikemi pada tikus kelompok 2 dan 3 selama 24 jam. Hari H+3 pasca induksi STZ dilakukan pengukuran GDS pada semua kelompok tikus. Bersamaan dengan pengukuran GDS dilakukan pembuatan kavitas pada tulang femur sebelah kanan dan kiri tikus. Tikus dianestesi dengan diberikan injeksi ketamin *hydrochloride* 100mg/kg BB dan *xylazine* 4 mg/kg BB. Lokasi pembedahan adalah sisi lateral *femur*, \pm 0,5 cm dari persendian antara

tulang *femur* dengan *tibia* tikus kemudian insisi sepanjang 1 cm,

Pembuatan defek dilakukan menggunakan bur bulat dengan diameter 1 mm dan kedalaman 1 mm. Pengeburan dilakukan dengan kecepatan 10.000 rpm sambil diirigasi dengan larutan saline pada semua kelompok tikus. Kelompok 1 pada tikus normal dilakukan pembuatan defek pada tulang femur kiri lalu diisi dengan gel simvastatin sampai penuh dan pembuatan defek femur kanan tanpa pengisian (defek kosong). Kelompok 2, pada tikus DM dilakukan pembuatan defek pada tulang femur kiri lalu diisi dengan gel CMC-Na (*Carboxy methyl cellulosa-natrium*) ke dalam defek sampai penuh sebagai *placebo*, sedangkan pada tulang femur kanan dilakukan pembuatan defek tanpa pengisian (defek kosong). Kelompok 3, tikus DM dilakukan pembuatan defek tulang femur kanan lalu diisi gel simvastatin ke dalam defek sampai penuh. Pemberian antibiotik gentamisin sulfat 2-4 mg/kg BB/24 jam intramuskular dan analgesik meloksikam 1-2 mg/kg BB/24 jam peroral pasca pembedahan pada semua kelompok tikus. Hari H+5, H+8 dan H+10 pasca pembuatan defek dipilih 5 ekor tikus masing-

masing kelompok, dilakukan pengukuran GDS dan penimbangan berat badan kemudian diikuti dengan dekapitasi pada semua kelompok tikus dengan teknik pemberian kloroform pada semua kelompok tikus.

Pengambilan spesimen defek tulang femur sebelah kanan dan kiri (tikus kelompok 1 dan 2) serta tulang femur kanan (tikus kelompok 3). Spesimen tulang femur tersebut difiksasi dalam larutan formalin 10% kemudian diproses dengan metode paraffin kemudian dilakukan pewarnaan dengan metode imunohistokimia untuk melihat ekspresi osteokalsin. Setelah itu dibuat *slide* lalu dibuat perhitungan untuk memperoleh persentase rata-rata dari satu *slide*. Pengamatan ekspresi osteokalsin menggunakan mikroskop cahaya Nikon Eclips E600 (USA) dengan pembesaran 400 kali. Data hasil penelitian ini diuji dengan Anova dua jalur untuk mengetahui adanya perbedaan antarkelompok perlakuan dan hari pengamatan. Dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan tersebut berada dikelompok perlakuan mana. Taraf signifikansi adalah 95% ($\alpha = 0,05\%$).

HASIL PENELITIAN

Tabel 1. Gambaran Rerata Berat Badan Tikus pada semua kelompok tikus sebelum tindakan sampai akhir dekapitasi H+10 (dekapitasi pada H+5, H+8 dan H+10).

Kelompok	Hari ke-1 ($\bar{x} \pm SD$)	Hari ke-3 ($\bar{x} \pm SD$)	Hari ke-5 ($\bar{x} \pm SD$)	Hari ke-8 ($\bar{x} \pm SD$)	Hari ke-10 ($\bar{x} \pm SD$)	P
I	2131±127	2133±150	2087±105	2202±165	2264±187	0,107
II	2191±159	2068±169	1950±124	1908±100	1904±74	0,000
III	2174±131	2064±118	1959±56	1872±60	1833±43	0,000

Keterangan:

\bar{x} = rerata; SD = Standar Deviasi / Simpangan Baku

Tabel 2. Gambaran Rerata GDS Tikus pada semua kelompok tikus dari sebelum tindakan sampai akhir dekapitasi H+10 (dekapitasi pada H+5, H+8 dan H+10).

Kelompok	Hari ke-1 ($\bar{x} \pm SD$)	Hari ke-3 ($\bar{x} \pm SD$)	Hari ke-5 ($\bar{x} \pm SD$)	Hari ke-8 ($\bar{x} \pm SD$)	Hari ke-10 ($\bar{x} \pm SD$)	P
I	102,7±11,2	107,0±11,2	116,0±8,7	120,6±16,5	118,6±11,9	0,001
II	110,2±7,3	380,6±82,2	442,2±89,7	463,3±58,5	465,2±59,7	0,000
III	106,5±10,5	298,8±96,5	465,0±112,6	422,9±83,5	470,2±28,1	0,000

Keterangan:

\bar{x} = rerata; SD = Standar Deviasi / Simpangan Baku

Tabel 3. Deskriptif Rerata Ekspresi Osteokalsin pada semua kelompok tikus dekapitasi H+5, H+8 dan H+10.

No	Kelompok	hari ke-5 ($\bar{x} \pm SD$)	Hari ke-8 ($\bar{x} \pm SD$)	Hari ke-10 ($\bar{x} \pm SD$)
1	Normal kosong	49,50±11,78	60,50±7,15	68,00±5,12
2	Normal gel simvastatin	54,00±4,18	66,00±6,51	78,00±5,70
3	DM kosong	24,00±7,41	32,00±4,47	37,00±8,36
4	DM gel CMC-Na	25,00±7,07	29,00±5,47	36,00±5,47
5	DM gel simvastatin	47,00±5,70	52,00±5,70	61,00±5,47

Keterangan:

\bar{x} = rerata; SD = Standar Deviasi / Simpangan Baku

Tabel 4. Hasil uji normalitas data rerata ekspresi osteokalsin pada semua kelompok tikus dekapitasi pada H+5, H+8 dan H+10.

Kelompok	p value Shapiro-Wilk		
	H+5	H+8	H+10
Normal kosong	0,647	0,087	0,236
Normal gel simvastatin	0,314	0,075	0,814
DM kosong	0,777	0,086	0,314
DM gel CMC-Na	0,325	0,066	0,135
DM gel simvastatin	0,814	0,814	0,135

Tabel 5. Hasil uji homogenitas data rerata ekspresi osteokalsin pada semua kelompok tikus dekapitasi pada H+5, H+8 dan H+10.

F	db1	db2	p value
0,410	14	60	0,966

Tabel 6. Hasil uji Anova dua jalur rerata ekspresi osteokalsin pada semua kelompok tikus dekapitasi pada H+5, H+8 dan H+10.

Variabel	F	p value
Jenis perlakuan	93,404	0,000*
Waktu	36,890	0,000*
Jenis perlakuan* Waktu	0,880	0,539

Keterangan: *) perbedaan bermakna p<0,05

PEMBAHASAN

Penelitian ini memperlihatkan penurunan berat badan tikus (Tabel 1) yang signifikan pada kelompok tikus DM (kelompok 2 dan 3) ($p < 0,05$), rata-rata penurunan berat badan tikus ke-

lompok 2 sebesar 10% dan kelompok 3 sebesar 11%. Penurunan berat badan ini berawal dari efek defisiensi insulin dimana terjadi perubahan metabolisme jaringan lemak dan protein di otot. Penelitian lain juga menunjukkan penurunan berat badan tikus sebanyak 25% dan 14% dari berat badan awal setelah diinduksi STZ.^{11, 13}

Kadar gula darah sesaat (GDS) pada tikus model diabetes melitus dalam penelitian ini meningkat pesat pasca induksi streptozotocin (STZ) ($p < 0,05$). Kadar GDS tikus kelompok 2 dan 3 mengalami peningkatan rata-rata 3-4 kali lipat saat pemeriksaan sebelum dekapitasi H+5, H+8 dan H+10 (Tabel 2). Induksi STZ pada tikus di penelitian ini, menyebabkan tikus menderita diabetes melitus tipe 1. Terjadi gangguan pada sekresi insulin karena sel β Langerhans yang memproduksi insulin telah rusak. Ketidakmampuan tubuh memanfaatkan glukosa yang tinggi itu karena ketiadaan insulin sebagai hormon anabolik yang diperlukan untuk pengambilan glukosa dan asam amino oleh jaringan perifer.^{14, 2, 15}

Ekspresi osteokalsin pada penelitian ini diperiksa dengan menggunakan pengecatan imunohistokimia terhadap spesimen tulang *femur* tikus. Persentase ekspresi osteokalsin kemudian diuji dengan Anova dua jalur untuk mengetahui adanya perbedaan antarkelompok perlakuan dan hari pengamatan, yang sebelumnya harus diuji normalitas dan homogenitasnya ($p > 0,05$) (Tabel 4 dan 5). Hasil uji Anova dua jalur (Tabel 6) pengaruh masing-masing kelompok jenis perlakuan (kelompok normal kosong, kelompok normal gel simvastatin, kelompok DM kosong, kelompok DM gel CMC-Na dan kelompok DM gel simvastatin) terhadap ekspresi osteokalsin sangat signifikan ($p < 0,05$).

Gambaran ekspresi osteokalsin (Tabel 3) tertinggi terjadi pada kelompok normal dengan gel simvastatin, kemudian diikuti oleh kelompok

Tabel 7. Hasil uji *Post Hoc Tukey* rerata ekspresi osteokalsin pada semua kelompok tikus dekapitasi pada H+5, H+8 dan H+10.

Hari		Normal kosong	Normal gel simvastatin	DM kosong	DM gel CMC-Na	DM gel simvastatin
5	Normal kosong	-				
	Normal gel simvastatin	0,999	-			
	DM kosong	0,000*	0,000*	-		
	DM gel CMC-Na	0,000*	0,000*	1,000	-	
	DM gel simvastatin	1,000	0,934	0,000*	0,000*	-
8	Normal kosong	-				
	Normal gel simvastatin	0,991	-			
	DM kosong	0,000*	0,000*	-		
	DM gel CMC-Na	0,000*	0,000*	1,000	-	
	DM gel simvastatin	0,774	0,083	0,001*	0,000*	-
10	Normal kosong	-				
	Normal gel simvastatin	0,534	-			
	DM kosong	0,000*	0,000*	-		
	DM gel CMC-Na	0,000*	0,000*	1,000	-	
	DM gel simvastatin	0,934	0,011*	0,000*	0,000*	-

Keterangan: *) perbedaan bermakna $p < 0,05$

normal kosong (tanpa aplikasi). Gambaran pada penelitian ini sesuai dengan penelitian yang lain dimana penelitian dilakukan pada kavitas *femur* tulang kelinci yang dikelompokkan menjadi dua yaitu: kelompok simvastatin dan kelompok kontrol. Kelompok simvastatin ekspresi osteokalsinnya lebih meningkat 0,5–1 kali lipat jika dibandingkan kelompok kontrol.¹⁶ Simvastatin mampu meningkatkan osteoblas dan ekspresi marker tulang, seperti *bone morphogenetic protein* (BMP), osteocalcin, osteopontin dan alkaline fosfatase (ALP).⁸

Mekanisme simvastatin mampu meningkatkan ekspresi osteokalsin dengan cara menghambat sintesis kolesterol pada jalur mevalonat dan juga akan menghambat *farnesyl-pyrophosphate* (FPP) dan *geranylgeranyl-pyrophosphate* (GGPP).^{17, 18} Simvastatin mempunyai 2 cincin utama pada gugus rantai kimianya, yaitu: ester dimetil butirat dan asam hidroksil. Asam hidroksil pada gugus rantai kimia simvastatin terbentuk atas 6 molekul yang mirip dengan senyawa enzim *intermediate* pada reaksi enzim *HMG-CoA reductase* di jalur mevalonat. Akibat kesamaan molekul tersebut, simvastatin mampu menghambat jalur mevalonat. Simvastatin merupakan inhibitor kompetitif yang bersifat reversibel terhadap enzim *HMG-CoA reductase*.¹⁹

Penghambatan pada FPP akan mengaktivasi jalur sinyal RAS–PI3K–Akt/MAPK, dimana jalur tersebut akan meningkatkan ekspresi BMP-2 dan Runx2 yang akan memperangaruhi diferensiasi stem sel mesenkim menjadi osteoblas. Penekanan pada mekanisme Rho dan Rho-kinase oleh statin melalui jalur GGPP, maka terjadi peningkatan ekspresi osteokalsin. Inhibisi secara langsung oleh statin pada Rho-kinase oleh inhibitor Rho-kinase akan meningkatkan ekspresi BMP-2 dan osteokalsin mRNA.^{17, 18}

Ekspresi osteokalsin kelompok DM kosong dan kelompok DM gel CMC-Na (Tabel 3) memiliki nilai ekspresi osteokalsin yang sama rendah dan perbedaannya tidak bermakna (Tabel 7) disemua hari pengamatan. Penjelasan adalah pada kondisi DM terjadi kadar glukosa darah yang tinggi akan menghambat fungsi dan formasi osteoblas, serta menurunkan formasi pembentukan mineral matriks tulang. Terhambatnya formasi osteoblast bisa terjadi karena adanya gangguan pada sinyal jalur BMP-2 pada kondisi hiperglikemia. Jalur BMP, khususnya BMP-2, memegang peranan pada proses diferensiasi osteogenik stem sel mesenkim menjadi osteoblas. Kondisi hiperglikemia, kadar BMP-2 intraseluler secara signifikan berkurang dan aktivasi sinyal jalur BMP otomatis juga tertekan.²⁰

Kondisi tulang jika terjadi defisiensi insulin akan menemukan jumlah osteoblas yang berkurang sehingga ekspresi osteokalsin juga ikut berkurang, lebih lanjut *bone formation* menjadi menurun. *Growth Factor* dan *Insulin Growth Factor* menurun jumlah kadarnya. Terjadi resistensi vitamin D dan metabolit aktifnya 1,25-dihidroksi-vitamin D otomatis menurun. Metabolit aktif tersebut menstimulasi osteokalsin pada level transkripsi.²¹

Ekspresi osteokalsin pada kelompok DM tertinggi (Tabel 3) terlihat pada kelompok DM gel simvastatin dan perbedaan ekspresi osteokalsin tersebut sangat bermakna (Tabel 7) di semua hari pengamatan. Kondisi ini sejalan dengan penelitian lain yang meneliti osteokalsin pasien sebelum menjalani terapi simvastatin dan saat menjalani terapi pada pasien diabetes wanita yang mengalami menopause. Saat pasien menjalani terapi simvastatin, terjadi peningkatan osteokalsin sebanyak 84%.²²

Hasil uji Anova dua jalur pengaruh waktu terhadap ekspresi osteokalsin sangat signifikan ($p < 0,05$) (Tabel 6). Ekspresi osteokalsin meningkat seiring dengan bertambahnya waktu/hari pengamatan yaitu H+5, H+8 dan H+10 pasca pembuatan defek. Osteokalsin dikenal sebagai protein yang terlibat dalam proses diferensiasi osteogenik dan disekresikan oleh osteoblas sesaat proses kalsifikasi/mineralisasi tulang dimulai. Peningkatan ekspresi osteokalsin seiring waktu artinya sel-sel mesenkimal telah mulai berdiferensiasi menjadi preosteoblas dan akhirnya menjadi osteoblas.⁷

Melalui uji *Post Hoc Tukey* (Tabel 7) perbandingan antarsesama kelompok DM (DM kosong, DM gel CMC-Na dan DM gel simvastatin), terlihat kelompok DM dengan aplikasi gel simvastatin terjadi peningkatan proses penyembuhan tulang yang ditandai dengan peningkatan ekspresi osteokalsin ($p < 0,05$) pada semua hari pengamatan. Kondisi DM terjadi penghambatan fungsi dan formasi osteoblas, bentuk organela sitoplasma osteoblas kurang berkembang baik dan penurunan ekspresi osteokalsin. Kondisi DM tersebut dapat diatasi dengan aplikasi topikal simvastatin, melalui jalur penghambatan mevalonat, mampu meningkatkan ekspresi osteokalsin pada proses penyembuhan tulang tikus model diabetes melitus.

KESIMPULAN

Persentase ekspresi osteokalsin lebih meningkat jumlahnya secara signifikan pada proses penyembuhan tulang tikus model diabetes melitus dengan pemberian topikal simvastatin jika dibandingkan dengan tanpa pemberian topikal simvastatin.

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh aplikasi topikal simvastatin terhadap penyembuhan tulang pada tikus model diabetes melitus yang mengalami komplikasi mikroangiopati.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh aplikasi topikal simvastatin terhadap penyembuhan tulang pada tikus model diabetes melitus dan dikombinasi dengan bahan-bahan yang dipakai dalam bidang bedah mulut, seperti: skrup osteosintesis, implan dan graft.

DAFTAR PUSTAKA

1. Valero, A. M., García, J. C. F., Ballester, A. H., and Rueda, C. L., 2007, Effects of Diabetes on The Osseointegration of Dental Implants, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*;12:E38-43.
2. Mitchell, R. N., Kumar, V., Abbas, A. K., dan Fausto, N., 2009, *Robbins dan Cotran Buku Saku Dasar Patologis Penyakit (terj.)*, EGC, Jakarta, hal.: 669-678.
3. Hofbauer, L. C., Brueck, C. C., Singh, S. K., and Dobnig, H., 2007, Review Osteoporosis in Patients With Diabetes Melitus, *J Bone Miner Res*; 22:1317-1328.
4. Kagel, E. M., and Einhorn, T. A., 1996, Alterations of Fracture Healing in The Diabetic Condition, *Iowa Orthop. J.*; 16: 147-152.
5. Graves, D. T., Alblowi, J., Paglia, D. N., O'Connor, J. P., and Lin, S., 2011, Impact of Diabetes on Fracture Healing, *J. Exp. Clin. Med.*; (3)1: 3-8.
6. Ivaska, K., 2005, *Osteocalcin Novel Insights Into The Use of Osteocalcin as A Determinant of Bone Metabolism*, <http://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/46615/diss2005ivaska.pdf?Sequence=1>. Diakses tanggal 12/05/2010.
7. Tanaka, S., Matsuzaka, K., Sato, D., and Inoue T., 2007, Characteristics of Newly Formed Bone During Guided Bone Regeneration: Analisis of CBFA-1, Osteocalcin and VEGF Expression, *J. of Oral Implantology*; (XXXIII) 6: 321-326.

8. Park, J., 2009, The Use of Simvastatin in Bone Regeneration, *Med. Oral Patol Oral Cir Bucal* 1; (14) 9: e 458-8.
9. Wang, J. W., Xu, S. W., Yang, R. K., and Lv, R. K., 2007, Locally Applied Simvastatin Promotes Fracture Healing in Ovariectomized Rat, *Osteoporos Int.*;18: 1641-1650.
10. Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Mehrabi, M. R., Jamshidi, Sh., Farhangi, A., Verdi, A. A., Mofidian, S. M. A., and Rad, B. L., 2007, Induction of Diabetes by Streptozotocin in Rats, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22 (2): 60-64.
11. Nakhaee, A., Bokaelan, M., Saravani, M., and Akbarzadeh, A., 2009, Attenuation of Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats by *Eucalyptus Globulus*, *Indian Journal of Biochemistry*, 24(4): 419-425.
12. Kiran, G., Nandini, CD., Ramesh, HP., and Salimath, PV., 2012, Progression of Early Phase Diabetic Nephropathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Evaluation of Various Kidney-Related Parameters, *Indian J Exp Biol*; Vol. 50; 133-140.
13. Gurney, A. M., and Howarth, F. C., 2009, Effects of Streptozotocin-induced diabetes on The Pharmacology of Rat Conduit and Resistance Intrapulmonary Arteries, *Cardiovascular Diabetology*, 8:4: 1 – 10.
14. Nugroho, A. E., 2006, Hewan Percobaan Diabetes Melitus: Patlogi dan Mekanisme Aksi Diabetogenik, *Biodiversitas* Vol 7, No. 4, Oktober: 378 -382.
15. Ozougwu, J. C., Obimba, K. C., Belonwu, C. D., and Unakalamba, C. B., 2013, Review The Pathogenesis and Pathophysiology of Type 1 and Type 2 Diabetes melitus, *J. Physiol. Pathophysiol.*, Vol. 4(4): 46 – 57.
16. Rosselli, J. E. G. C., Martins, D. M. F. S., Martins, J. L., Mendes de Oliveira, C. R. G. C., Fagundes, D. J., and Taha, M. O., 2014, The Effect of Simvastatin on The Regeneration of Surgical Cavities in The Femur Rabbits, *Acta Cirurgica Brasileira* Vol. 29 (2): 87-92.
17. Ohnaka, K., Shimoda, S., Nawata, H., Shimokawa, H., Kaibuchi, K., Iwamoto, Y., and Takayanagi, R., 2001, Pitavastatin Enhanced BMP-2 and Osteocalcin Ekspression by Inhibition of Rho-Associated Kinase in Human Osteoblasts, *Biochemical and Biophysical Research Communication* Vol. 287. No. 2.: 337-342.
18. Ruan, F., Zheng, Q., and Wang, J., 2012, Mechanism of Bone Anabolism Regulated by Statin, *Biosci. Rep.* 32: 511-9.
19. Singh, S. K., Dodwad, V., and Dhariwal, G., 2012, Simvastatin and Periodontal Regeneration, *JPBMS*, Vol. 21, Issue 21: 1-4.
20. Juncheng, W., Bin, W., Ying, L., Dongsheng, W., Lingling, E., Yang, B., and Hongcheng, L., 2013, High Glucose Inhibit Osteogenic Differentiation Through The BMP Signaling Pathway in Bone Mesenchymal Stem Cells in Mice, *EXCLI Journal*; 12: 584-597.
21. Buouillon, R., 1991, Diabetic Bone Disease, *Calcif Tissue Int* 49: 155 – 160.
22. Amara, F. E., Lachine, N.A., Hassab, A., Meleis M. E., Moursy, E. Y., El-Sheikh, S. A., Megallaa, M. H., and Hassan, H., 2011, Statin A Double Weapon in Treating Dyslipidemia Osteoporotic Menopausal Type 2 Diabetic Women, *Journal of Diabetology*, 2:3:1-9.