

AKIBAT APLIKASI SIMVASTATIN PADA PROSES PENYEMBUHAN TULANG TERHADAP EKSPRESI KOLAGEN TIPE I (Pada Binatang Coba Tikus Diabetes Melitus Tipe 1)

Irvan Lubis*, M.Masykur Rahmat **, dan Rahardjo**

*Program Studi Ilmu Bedah Mulut dan Maksilofasial Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis FKG UGM

**Bagian Bedah Mulut dan Maksilofasial FKG UGM

ABSTRAK

Latar belakang. Kondisi patologis pada penderita diabetes melitus dapat berhubungan dengan beberapa komplikasi, termasuk gangguan penyembuhan tulang. Simvastatin dikenal sebagai obat penurun kolesterol yang telah banyak digunakan untuk meningkatkan massa tulang dengan menginduksi *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2) pada osteoblas dan menstimulasi pembentukan tulang. Simvastatin pada aplikasi lokal akan menginduksi dan mempercepat pembentukan tulang lokal dan memicu ekspresi dini faktor pertumbuhan yang mengatur angiogenesis, differensiasi sel-sel tulang dan osteogenesis. Kolagen tipe I merupakan salah satu *marker* pembentukan tulang pada proses penyembuhan tulang yang diproduksi oleh osteoblas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui akibat aplikasi simvastatin pada proses penyembuhan tulang terhadap ekspresi kolagen tipe I pada binatang coba tikus diabetes melitus tipe 1.

Metode. Penelitian eksperimental dengan 45 ekor tikus *Sprague Dawley*, dibagi dalam 3 kelompok. Kelompok 1 yaitu 15 ekor tikus normal dengan pembuatan defek pada femur kiri yang diberi gel simvastatin, sedangkan defek femur kanan tanpa pengisian. Kelompok 2 yaitu 15 ekor tikus DM dengan defek femur kiri yang diberi gel CMC-Na dan defek femur kanan tanpa pengisian. Kelompok 3 yaitu 15 ekor tikus DM dengan defek pada femur kanan yang diberi gel simvastatin. Semua kelompok akan didekapitasi pada hari ke-5, ke-8 dan ke-10 pasca pembuatan defek. Akhirnya dilakukan pemeriksaan *Immunohistochemistry* (IHC) pada semua sampel untuk melihat ekspresi kolagen tipe I sesuai dengan hari pengamatan.

Hasil. Jumlah persentase ekspresi kolagen tipe I antara tikus DM yang diberi gel simvastatin dengan tikus DM tanpa pemberian gel simvastatin terdapat perbedaan yang bermakna ($P < 0,05$).

Kesimpulan. Aplikasi simvastatin signifikan meningkatkan jumlah persentase ekspresi kolagen tipe I pada proses penyembuhan tulang binatang coba tikus diabetes melitus tipe 1.

Kata kunci: *Diabetes melitus tipe 1, simvastatin, kolagen tipe I.*

ABSTRACT

Background. Pathological condition in diabetes mellitus patients may associate with several complications, including bone-healing disorder. Simvastatin is known as cholesterol-lowering drugs which have been widely used to increase bone mass by inducing bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) on osteoblasts and stimulate bone formation. Local application of simvastatin will induce and accelerate bone formation locally and trigger early expression of growth factors that regulates angiogenesis, differentiation of bone cells and osteogenesis. Type I collagen is one marker of bone formation in the healing process of bone produced by osteoblasts. This study aims to describe the effect of application simvastatin in the process of bone healing to type I collagen expression on rats model with type 1 diabetes mellitus.

Methods. Experimental research with 45 *Sprague Dawley* rats was divided to 3 groups. Group 1 is 15 normal rats with defect in the left femurs. They were given with simvastatin gel and the right femurs defects were left without it. Group 2 is 15 DM rats with defects in the left femurs. They were given with CMC-Na gel, while the right femurs were not. Group 3 is 15 DM rats with defects in the right femurs and filled with simvastatin gel. All groups were decapitated on day 5th, 8th and 10th post manufacture defect. Finally immunohistochemistry (IHC) examination conducted in all samples to examine the expression of type I collagen according to the observations days.

Results. Total percentage of type I collagen expression between diabetic rats that were given simvastatin gel compared to DM rats which were not given with simvastatin gel resulted significant difference ($P < 0.05$).

Conclusion. Application of simvastatin on bone rats model with type 1 diabetes mellitus significantly increased the percentage of type 1 collagen expression during the bone healing process.

Keywords: *Type 1 diabetes mellitus, simvastatin, type I collagen.*

PENDAHULUAN

Diabetes Melitus (DM) adalah salah satu penyakit yang paling sering diderita dan penyakit kronik yang serius di Indonesia saat ini. Setengah dari jumlah kasus diabetes melitus tidak terdiagnosa karena pada umumnya diabetes tidak

disertai gejala sampai terjadinya komplikasi. Berdasarkan pola pertumbuhan penduduk saat ini diperkirakan jumlah penderita diabetes melitus di dunia tahun 1998 sebanyak 140 juta jiwa. Prediksi Dr Hilary King dari WHO menyatakan akan meningkat menjadi 300 juta pada tahun 2025.

Jumlah tersebut lebih dari 150 juta akan berada di Asia (Cockram, 2000). Indonesia adalah negara keempat di dunia yang paling padat dengan jumlah penduduk 237,6 juta orang pada tahun 2010. Indonesia juga memiliki jumlah pasien diabetes terbesar ketujuh (7,6 juta), meskipun prevalensi yang relatif rendah (4,8 % termasuk diabetes tipe 1 dan 2 pada individu berusia 20-79 tahun) pada tahun 2012 (Soewondo P dkk, 2013).

Diabetes melitus adalah gangguan metabolisme yang dihasilkan dari kerusakan pada sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya. Defisiensi insulin dapat menyebabkan hiperglikemia kronis dengan gangguan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein (Lachin T dan Reza H, 2012). Pembagian DM menurut WHO dan NDDG (*National Diabetes Data Group*) di Amerika tahun 1997 secara garis besar ada 2 kategori, DM tipe 1 atau *Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (IDDM), terjadi karena kerusakan sel β pankreas mengakibatkan defisiensi absolut dari sekresi insulin dan DM tipe 2 atau *Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (NIDDM) terjadi karena penurunan kemampuan insulin bekerja di jaringan perifer (*insulin resistance*) dan disfungsi sel β sehingga sel β pankreas tidak mampu memproduksi insulin yang cukup untuk mengkompensasi *insulin resistance* (Retzepi M dan Donos N, 2010).

Munculnya bahan insulin dapat meningkatkan aktifitas dan harapan hidup lebih lama. Namun demikian, perawatan fraktur pada penderita DM masih merupakan masalah bagi ahli bedah. Beberapa penelitian klinis, analisis penyembuhan fraktur pada pasien DM menunjukkan secara signifikan suatu keterlambatan penyatuan (*delayed union*), tidak bersatu (*nonunion*) dan pseudoarthrosis. Diabetik osteopati, salah satu komplikasi induksi diabetes, dapat mengurangi pembentukan tulang, mengganggu penyembuhan tulang dan dapat terjadi osteoporosis. Diabetes Melitus juga dapat mengubah sifat biomekanik yang memperlihatkan pengurangan proliferasi sel dan sintesis kolagen selama proses penyembuhan tulang (Amit Sood dkk, 2013).

Streptozotocin disebut juga STZ, N-Nitro turunan dari glukosamine merupakan antibiotik spektrum luas dan bahan kimia toksik yang sangat toksik pada pankreas terutama sel-sel beta penghasil insulin pada mamalia. Induksi diabetes eksperimental pada tikus percobaan dengan menggunakan streptozotocin ini sangat nyaman dan mudah digunakan. Injeksi strepto-

zotocin mengarah kedegenerasi sel beta pulau Langerhans (Abeeleh MA dkk, 2009).

Induksi diabetes dengan streptozotocin ini menghasilkan diabetes eksperimental yang relevan dengan kondisi endogenous kronik akibat dari hiperglikemi. Streptozotocin menginduksi toksik sel beta pankreas dengan cepat dan membuat nekrosis irreversibel sel beta pankreas. (Arora dkk, 2009). Secara klinis gejala DM jelas terlihat pada tikus percobaan 2-4 hari setelah injeksi intravena maupun intraperitoneal (Abeeleh MA dkk, 2009).

Penelitian yang dilakukan Garrett dan Mundy, 2002 membuktikan secara *in vitro* bahwa simvastatin menyebabkan peningkatan akumulasi osteoblas dan pembentukan tulang baru pada kultur neonatal murin di calvaria juga penelitian secara *in vivo* membuktikan bahwa injeksi simvastatin secara lokal pada calvaria dari tikus normal menghasilkan 30-50% peningkatan lebar calvaria. Hal ini mengindikasikan bahwa simvastatin memiliki pengaruh langsung pada pembentukan tulang ketika diaplikasikan secara lokal. Penelitian Wong dan Robie, juga menunjukkan bahwa pemberian simvastatin memicu akselerasi pembentukan tulang lokal, ekspresi dini dari *growth factor*, diferensiasi tulang dan osteogenesis (Wong RWK, Rabie ABM, 2005).

Metabolisme tulang dapat dilihat pada biokimia dengan menggunakan *marker* pembentukan tulang. *Marker* pembentukan tulang terdiri dari kolagen tipe I, Alkalin phosphatase dan osteocalcin. (Ruiz S dkk, 2007). Salah satu *marker* pembentukan tulang adalah kolagen tipe 1. Kolagen tipe I merupakan tipe kolagen yang paling banyak ditemui, tersebar di hampir semua jaringan ikat kecuali pada tulang rawan hyalin. Kolagen tipe I adalah protein utama dalam tulang, kulit, tendon, ligamen, sclera, kornea, dan pembuluh darah dan juga kolagen tipe I ini meliputi 95% dari kandungan kolagen seluruh tulang dan sekitar 80% dari total protein yang terdapat dalam tulang. (Carrin V dkk, 2006). Pada penelitian ini akan menggunakan kolagen tipe I sebagai *bone marker* karena kolagen tipe I merupakan kolagen terbanyak pada tulang (80%) sedangkan selebihnya adalah kolagen tipe III dan X (Ferdiansyah dkk, 2011)

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui akibat aplikasi simvastatin pada proses penyembuhan tulang terhadap ekspresi kolagen tipe I pada binatang coba tikus diabetes melitus

tipe 1 dengan pemeriksaan *immunohistochemistry* (IHC).

METODE PENELITIAN

Empat puluh lima (45) ekor tikus yang memenuhi kriteria ditempatkan pada kandang yang tersedia dan dipelihara selama 2 hari sebelum dilakukan penelitian untuk adaptasi. Makanan dan minuman diberikan ad libitum. Randomisasi dilakukan secara acak sederhana untuk menentukan kelompok penelitian.

Pengukuran GDS dilakukan pada H+3 pasca induksi STZ terhadap semua kelompok tikus. Bersamaan pengukuran GDS dilakukan pembuatan defek pada tulang femur tikus yang sebelumnya tikus diberikan injeksi ketamin hydrochloride 100 mg/kgBB dan xylazine 4 mg/kgBB sebagai anastesinya. Dalam keadaan teranastesi pada daerah operasi dilakukan pencukuran bulu dilanjutkan dengan aplikasi povidone iodine 10%, kemudian ditutup dengan duk lubang yang steril. Lokasi pembedahan adalah pada sisi medial tulang femur sebelah kanan lateral $\pm 0,5$ cm dari persendian antara tulang femur dengan tibia tikus. Incisi sepanjang 1 cm lalu dilakukan diseksi sampai tulang femur terlihat.

Kelompok 1 pada tikus normal dilakukan pembuatan defek pada tulang femur kiri lalu diisi dengan gel simvastatin sampai penuh pada defek 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*) kedalam defek yang telah dibuat 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 dengan gel simvastatin kedalam defek yang telah dibuat sampai penuh.

HASIL PENELITIAN

Tabel 1. Deskripsi Rerata Berat Badan Tikus pada semua kelompok dari sebelum tindakan H+1 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 \pm 127	2133 \pm 150	2087 \pm 105	2202 \pm 165	2264 \pm 187	0,107
II	2191 \pm 159	2068 \pm 169	1950 \pm 124	1908 \pm 100	1904 \pm 74	0,000
III	2174 \pm 131	2064 \pm 118	1959 \pm 56	1872 \pm 60	1833 \pm 43	0,000

Penjahitan luka incisi sebanyak dua lapis pada otot dan kulit dengan benang PDS II ukuran 4-0. Pemberian antibiotik gentamicin sulfat 2-4 mg/kg BB/ 24 intramuskular dan analgesik meloksikam 1-2 mg/kg BB/24 jam peroral pasca pembedahan pada semua kelompok tikus. Pada H+5, H+8 dan H+10 dilakukan pengukuran GDS pasca pembuatan defek, setelah itu diikuti dengan dekapitasi pada semua kelompok tikus dengan chloroform. Pengambilan spesimen defek tulang sepanjang tulang femur dan difiksasi dalam larutan formalin 10%, untuk pembuatan slide dan pemrosesan jaringan lalu dilakukan pemrosesan pewarnaan Immunohistokimia (IHC) dengan *Primer Antibody Rabbit Anti-Collagen I Polyclonal Antibody*.

Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya Nikon Eclips E600 (USA) dengan pembesaran 400 kali. Pewarnaan antibodi yang positif (+) maka pada sel osteoblas akan berwarna kecoklatan yang menggambarkan ekspresi kolagen tipe I, jika pewarnaan antibodi negatif (-) maka pada sel osteoblas akan berwarna biru keunguan, hal ini menggambarkan tidak adanya ekspresi kolagen tipe I. Setelah itu dibuat slide lalu dibuat perhitungan pada setiap slide akan diamati pada 5 lapangan pandang, pada masing-masing lapangan pandang akan terlihat sel yang positif dan negatif, kemudian akan disajikan dalam bentuk persentase dengan rumus Jumlah sel yang berwarna positif dibagi jumlah sel yang berwarna positif dan negatif lalu dikalikan 100 % (Ferdiansyah dkk, 2011). Nilai dari masing-masing lapangan pandang pada setiap slide akan dijumlahkan kemudian dibagi 5 untuk memperoleh persentase rata-rata dari satu slide.

Analisis data hasil penelitian ini diuji dengan Anova dua jalur untuk mengetahui adanya perbedaan antar kelompok dan hari pengamatan, lalu dilanjutkan dengan uji pos hoc Tukey.

Tabel 2. Deskripsi Rerata GDS Tikus pada semua kelompok dari sebelum tindakan H+1 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

Tabel 3. Deskripsi Rerata Ekspresi kolagen tipe I dekapitasi H+5, H+8 dan H+10.

No	Kelompok	H+5 ($\bar{x} \pm SD$)	H+8 ($\bar{x} \pm SD$)	H+10 ($\bar{x} \pm SD$)
1	Normal kosong	50,70±13,46	60,00±11,72	68,50±12,69
2	Normal gel simvastatin	53,50±11,67	65,50±7,78	78,50±4,87
3	DM kosong	25,0±7,07	31,00±8,22	36,00±8,94
4	DM gel CMC-Na	24,00±7,42	31,00±8,22	35,00±7,07
5	DM gel simvastatin	46,00±7,41	51,00±10,84	60,50±7,16

PEMBAHASAN

Penurunan berat badan (Tabel 1) pada penelitian ini terjadi di kelompok DM (kelompok II dan III) yang signifikan dari hari H+1 hingga H+10 dengan rerata penurunan pada kelompok II sebesar 10,6% sedangkan pada kelompok III sebesar 11,18%, hal ini ditunjukkan dengan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$). Sejalan dengan penelitian Nakhaee dkk, 2009, menyebutkan ada penurunan berat badan yang signifikan pada tikus yang DM dengan induksi single Streptozotocin (65 mg/kgBB intraperitoneal) dibandingkan dengan tikus kontrol (tidak DM), mereka melihat berat badan, asupan makanan dan cairan, konsentrasi glukosa plasma dan HbA1c. Nakhee dkk, 2009 dan Kiran dkk, 2012 menyebutkan penurunan berat badan pada penderita DM dihasilkan dari protein yang terbuang karena ketidakmampuan karbohidrat untuk digunakan sebagai energi.

Penderita DM tipe I, kadar glukosa darah sangat tinggi, tetapi tubuh tidak dapat memanfaatkannya secara optimal untuk membentuk energi. Oleh karena itu, energi diperoleh melalui peningkatan katabolisme protein dan lemak. Seiring dengan kondisi tersebut, terjadi perangsangan lipolisis serta peningkatan kadar asam lemak bebas dan gliserol darah. Dalam hal ini terjadi peningkatan produksi asetil-KoA oleh hati, yang pada gilirannya diubah menjadi asam asetoasetat dan pada akhirnya direduksi menjadi asam α -hidroksibutirat atau mengalami dekarboksilasi menjadi aseton (Nakhaee dkk., 2009)

Penelitian ini juga dilakukan pengamatan terhadap rerata GDS pada semua kelompok tikus (Tabel 2). Kelompok I atau tikus normal juga mengalami kenaikan GDS sebesar 12,45% hal ini disebabkan oleh respon stress terhadap anestesi dan operasi. Hager P, 2008 menyebutkan respon stress adalah pola reaksi saraf dan hormon yang bersifat menyeluruh dan tidak spesifik terhadap setiap situasi apapun yang mengancam homeostasis. Respon stress dapat terjadi akibat kerusakan jaringan yang ditimbulkan oleh keadaan-keadaan seperti anestesi, operasi, syok, trauma, infeksi dan gangguan organ multipel yang dapat menyebabkan terjadinya perubahan fisiologis tubuh. Respon stress yang terjadi memicu sekresi hormon kortisol dari korteks adrenal selama operasi dan merupakan hormon paling dominan yang dapat menyebabkan peningkatan kadar gula darah. Efek keseluruhan dari kortisol adalah meningkatkan konsentrasi glukosa darah dengan cara mengorbankan simpanan protein dan lemak. Pada penelitian ini tikus normal akan mengalami respon terhadap pemberian anestesi dan pembuatan defek, pada tubuh tikus terjadi perubahan metabolisme karbohidrat berupa peningkatan glikogenolisis, gluconeogenesis, resistensi insulin oleh jaringan. Perubahan metabolisme lemak berupa peningkatan lipolisis. Perubahan metabolisme protein berupa asam amino diubah menjadi glukosa di hati. Peningkatan glikogenolisis ini yang menyebabkan pelepasan glukosa ke dalam darah dan mempengaruhi peningkatan kadar gula darah perioperatif (Hager P, 2008, Purnama N dkk, 2013 dan Sundbom R, 2013).

Perlakuan pada tikus normal dengan defek yang diberi gel simvastatin menunjukkan bahwa rerata hasil pengukuran ekspresi kolagen tipe 1 pada gambaran IHC-nya tertinggi dari semua kelompok perlakuan (Tabel 3). Ohnaka dkk., 2001 menyatakan simvastatin menginduksi ekspresi BMP-2 dalam osteoblas dan menstimulasi pembentukan tulang secara *in vitro* dan *in vivo* dan menghalangi prenylasi dari beberapa GTPase pada *mevalonate pathway*. Anabolisme tulang oleh statin dapat dihubungkan dengan tiga aspek yaitu promosi (meningkatkan) osteogenesis, penghambatan apoptosis osteoblas dan penekanan osteoklastogenesis. Beberapa molekul, seperti FPP (farnesyl pirofosfat), GGPP (geranylgeranyl pirofosfat), Ras dan ER (estrogen reseptor), memegang peranan penting pada regulasi anabolisme tulang oleh statin. (Garrett IR dan Mundy GR., 2002, Ohnaka dkk, 2001, Ruan F dkk, 2012).

Penelitian ini dilakukan induksi streptozotocin (STZ) pada tikus kelompok II dan III dengan dosis 40mg/kgBB via injeksi peritoneal, diharapkan dalam tiga hari tikus akan mengalami kerusakan pada sel beta pankreasnya dan membuat kondisi diabetes melitus tipe I. Motyl K & McCabe LR, 2009, menyebutkan beberapa model hewan penelitian khususnya tikus, dosis tunggal STZ (40 atau 60 mg/kgBB) telah efektif membuat induksi DM tipe 1. Nakhae dkk, 2009 dan kiran dkk, 2012 menyebutkan tikus yang diinduksi dengan STZ mengalami peningkatan kadar gula darah pada tikus model diabetes melitus sangat berarti yaitu rata-rata 200 – 500 mg/dL, dimana kadar gula darah normal pada tikus antara 80 – 135 mg/dL. Kenaikan GDS ini diakibatkan oleh STZ yang diinduksikan akan memasuki pankreas melalui saluran transporter glukosa 2 (GLUT2) di dalam membran plasma yang menyebabkan toksisitas seluler dan respon imun lokal yang dapat menyebabkan hypoinsulinemia dan hiperglikemia pada hewan model (Motyl K, McCabe LR, 2009)

Tikus DM tanpa aplikasi terlihat rerata hasil pengukuran ekspresi kolagen tipe 1 pada gambaran IHC-nya paling rendah dari semua kelompok perlakuan tetapi diatas tikus DM dengan aplikasi CMC-Na. Perbedaan rerata yang tidak signifikan antar tikus DM tanpa aplikasi dengan aplikasi CMC-Na karena sifat CMC-Na hanya digunakan sebagai karier (plasebo) untuk pembuatan gel simvastatin. Adel A.M dkk, 2010, Khoswanto C, 2010 menyebutkan CMC-Na memiliki

empat fungsi penting yaitu stabilizer, emulsifier, penebalan pembentuk agen gel. CMC-Na dibuat dalam bentuk bubuk putih atau kekuningan, tidak berbau, tidak berasa, *biodegradable* dan tidak toksik dengan karakteristik higroskopis tetapi tidak larut dalam larutan organik. CMC-Na mempunyai sifat yang tidak beracun dan tidak mengiritasi secara luas telah banyak digunakan dalam formulasi oral dan topikal terutama sebagai stabilizer, pengental dan dengan tujuan mengontrol pelepasan suatu zat.

Kelompok DM tanpa aplikasi terlihat ekspresi kolagen tipe 1 pada pemeriksaan IHC mengalami penurunan, hal ini disebabkan penurunan neovaskularisasi yang dapat memperburuk perbaikan tulang juga pada kondisi DM akan mengakibatkan hiperglikemi. Hiperglikemi ini akan menghambat diferensiasi osteoblastik dan mengubah respon hormon paratiroid yang mengatur metabolisme fosfor dan kalsium. Sinyal jalur BMP-2 dan aktivasi sinyal jalur BMP-2 akan tertekan yang akan menyebabkan jumlah BMP-2 intraselular secara signifikan akan berkurang pada kondisi hiperglikemi. BMP-2 ini memegang peranan pada proses diferensiasi osteogenik mesenkimal stem sel menjadi osteoblas. Osteoblas yang terbentuk mempunyai organela sitoplasma kurang berkembang dengan permukaan retikulum endoplasmikum yang kasar dan mengalami dilatasi irreguler, hal ini akan berpengaruh pada pembentukan osteoid yang berkurang (Juncheng dkk, 2013, Kobayashi, 1990).

Kelompok III tikus DM dengan aplikasi gel simvastatin, rerata jumlah ekspresi kolagen tipe 1 mengalami kenaikan, bila dibandingkan dengan jumlah rerata tikus DM tanpa aplikasi maka ekspresi kolagen tipe 1 pada tikus DM dengan aplikasi gel simvastatin mengalami kenaikan baik pada H+5, H+8, H+10. Sedangkan pada kondisi DM, Graves DT dkk, 2011, menyatakan penelitian secara *in vitro* bahwa koloni osteoblas dari mesenkimal stem sel yang diambil dari tikus diabetik menunjukkan penurunan jumlah dan ukuran osteoblas. Penelitian secara histologi, kondisi diabetes melitus dihubungkan dengan keterlambatan pembentukan tulang intramembranous, kebanyakan setelah minggu pertama dan selama minggu kedua pada penyembuhan tulang. Namun Assaf K dkk, 2013 menyatakan dengan pemberian simvastatin yang merupakan salah satu kelompok obat statin yang dapat menurunkan kolesterol tetapi dapat juga digunakan untuk meningkatkan massa tulang. Aplikasi

topikal simvastatin akan merangsang pembentukan tulang baik in vitro dan in vivo terkait dengan peningkatan ekspresi gen BMP-2 di sel-sel tulang yang akan meningkatkan ekspresi kolagen tipe 1. Ezirganl dkk, 2013 menyatakan efek aplikasi lokal simvastatin dapat meningkatkan penyembuhan tulang pada *critical size* defek tikus diabetik. Pengaruh simvastatin pada pembentukan tulang berhubungan dengan peningkatan ekspresi protein morfogenik tulang (BMP-2) dan meningkatkan ekspresi faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) yang merupakan faktor penting pada induksi diferensiasi osteoblas dan merangsang pembentukan tulang. Sehingga dengan pemberian topikal simvastatin dapat menekan kondisi DM tersebut.

Hasil uji Anova dua jalur pada pengaruh waktu terhadap ekspresi kolagen tipe I dengan nilai $p < 0,05$ terlihat signifikan. Setelah dilakukan pembuatan defek pada H+5, H+8 dan H+10, ekspresi kolagen tipe I meningkat seiring dengan bertambahnya waktu/hari. Kolagen tipe I merupakan salah satu marker pembentukan tulang yang diproduksi oleh osteoblas dan protein fibrilar pada matriks ekstraselular yang paling banyak (>90%) serta bahan utama pembentukan soft dan hard kallus selama penyembuhan tulang berperan dalam proses diferensiasi osteogenik, lebih dari 90% matrik organik tulang terdiri dari kolagen tipe I yang akan dibentuk menjadi tulang. Ekspresi kolagen tipe I dapat meningkat dengan bertambahnya waktu yaitu sel-sel mesenkimal telah mulai berdiferensiasi menjadi preosteoblas dan akhirnya menjadi osteoblas (Ivaska K, 2005, Kruger TE dkk, 2013)

Penelitian ini berdasarkan hasil uji Tukey diketahui bahwa rerata ekspresi kolagen tipe 1 tertinggi terjadi pada kelompok normal dengan gel simvastatin, tetapi tidak berbeda bermakna dengan kelompok normal tanpa simvastatin, serta dengan kelompok DM dengan gel simvastatin ($p > 0,05$) baik pada H+5, H+8 dan H+10. Ketiga kelompok tersebut berbeda bermakna dengan kelompok DM tanpa simvastatin maupun dengan gel CMC-Na ($p < 0,05$). Hal ini berarti bahwa pemberian simvastatin lebih baik dalam meningkatkan ekspresi kolagen tipe 1 pada tikus DM tipe 1 pada proses penyembuhan tulang dibandingkan dengan tikus DM tanpa simvastatin maupun gel CMC-Na.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian aplikasi simvastatin pada proses penyembuhan tulang terhadap ekspresi kolagen tipe I pada binatang coba tikus diabetes melitus tipe 1 maka dapat disimpulkan bahwa aplikasi simvastatin signifikan meningkatkan jumlah persentase ekspresi kolagen tipe I pada penyembuhan tulang binatang coba tikus diabetes melitus tipe 1.

SARAN

1. Pengamatan pada penelitian ini hanya dilakukan sampai hari ke-10 pasca pembuatan defek, agar diperoleh hasil penelitian yang lebih terperinci mengenai pengaruh aplikasi topikal simvastatin terhadap penyembuhan tulang DM, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan hari pengamatan yang lebih lama.
2. Perlu dilakukan uji coba terhadap penderita diabetes melitus dengan melihat proses penyembuhan tulang secara klinis sehingga lebih berdaya guna, efisien dan efektif dalam upaya peningkatan pelayanan bedah mulut.

DAFTAR PUSTAKA

- Abeeleh M A, Zuhair BI, Alzaben K R, Abu-Halaweh SA, Al-Essa MK, Abuabeeleh J, Moaath M. Alsmady, 2009, Induction of Diabetes Mellitus in Rats Using Intraperitoneal Streptozotocin: A Comparison Between 2 Strains of Rats, *European Journal of Scientific Research* Vol. 32 No.3 (2009), pp.398-402.
- Adel A.M, Abou-Youssef H, El-Gendy A.A and Nada A.M, 2010, Carboxymethylated Cellulose Hydrogel; Sorption Behavior and Characterization, *National Research Centre, Nature and Science, Cairo, Egypt*; 8(8).
- Amit Sood dkk, 2013, Review Article, The BB Wistar Rat as a Diabetic Model for Fracture Healing, *ISRN Endocrinology, Vol.2013: (P) 1-6*.
- Arora S, dkk, 2009, Characterisation of Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus in Swiss Albino Mice, *Global Journal of Pharmacology*, 3 (2): 81-84.
- Assaf K, Rezende Duek EA, Oliveira NM, 2013, Efficacy of a Combination of Simvastatin and Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) in Stimulating the Regeneration of Bone Defects, *Materials Research*; 16(1): 215-220.
- Carrin V dkk, 2006, The Role of Collagen in Bone Strength, *Osteoporos Int* 17: 319-336.

- Cokram CS, 2000, Seminar Papers, The Epidemiology of Diabetes Mellitus in the Asia-Pacific Region, *HKMJ Vol 6* : 43-52.
- Ezirganl S, Kazancıoğlu HO, Mihmanlı A, Aydın MS, Sharifov R, dan Alkan A, 2013, The effect of local simvastatin application on critical size defects in the diabetic rats, *Clin. Oral Impl. Res.* (p) 1–8.
- Ferdiansyah, Djoko Rushadi, Fedik Abdul Rantam, Aulani'am, 2011, Regenerasi pada Massive Bone Defect dengan Bovine Hydroxyapatite sebagai Scaffold Mesenchymal Stem Cell, *JBP Vol. 13, No. 3, September*: 179–195.
- Graves DT, Alblowi J, Paglia DN, o'connor JP, Lin S, 2011, Review Article Impact of Diabetes on Fracture Healing, *Journal of Experimental and Clinical Medicine*; 3(1):3e8, Elsevier Taiwan LLC.
- Hager P, 2008, *Systemic Stress Response and Hyperglycemia After Abdominal Surgery in Rat and Man*, Reprint, Karolinska Institute, Stockholm.
- 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. Diakses tanggal 12/05/2010.
- Juncheng W, Bin W, Ying Li, Dongsheng W, Lingling E, Yang B, Hongchen L, 2013, High Glucose Inhibits Osteogenic Differentiation Through the BMP Signaling Pathway in Bone Mesenchymal Stem Cell, *EXCLI Journal* ;12:584-597.
- Kobayashi T, 1990, Morphological studies on the healing process of fracture in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin, *Jpn. J. Oral Biol.*, 32: 600-644.
- Motyl K, McCabe LR, 2009, Streptozotocin, Type I Diabetes Severity and Bone, Shulin Li (ed.), *Biological Procedures Online, Volume 11, Number 1*.
- Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G, 1999, Stimulation of Bone Formation in Vitro and in Rodents by Statins. *Science* : 286: 1946–1949.
- Nakhaee, A., Bokaellan, 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.
- Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, Shimokawa H, Kaibuchi K, Imamoto Y dan Takayanagi R, 2001, Pitavastatin Enhanced BMP-2 and Osteocalcin Expression by Inhibition of Rho-Associated Kinase in Human Osteoblasts, *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol:287, Page:337–342.
- Purnama N, Sony, Fridayanti, 2013, Gambaran Kadar Gula Darah Perioperatif pada Pasien Bedah Elektif menggunakan Anestesi Umum di RSUD Arifin Achmad Provinsi Riau, *repository Unri* <http://repository.unri.ac.id:80/handle/123456789/2618>, diakses tanggal 1 April 2015.
- Retzeppi M dan Donos N, 2010, Invited Review, The Effect of Diabetes Mellitus on Osseous Healing, *Clinical Oral Implant Research*. 21, 673-68.
- Ruan F, Zheng Q, Wang J, 2012, Mechanisms of bone anabolism regulated by statins, *Bioscience Reports*/32/511-519.
- Ruiz S, Gaspa dan Nogues X, 2007, Simvastatin and Atorvastatin Enhance Gene Expression of Collagen Type 1 and Osteocalcin in Primary Human Osteoblasts and MG-63 Cultures, *Journal of Cellular Biochemistry* 101:1430–1438.
- Soewondo P dkk, 2013, *Challenges in Diabetes Management in Indonesia: a literature review*, Licensee BioMed Central Ltd, Globalization and Health, 9:63.
- Sundbom R, 2013, *Surgical Stress in Rats, The Impact of Buprenorphine on Postoperative Recovery*, Uppsala University, Department of Neuroscience, Comparative Medicine, Uppsala, Sweden.
- World Health Organization, 2006, *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia : report of a WHO/IDF consultation*, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Wong RWK, Rabie ABM, 2005, Early Healing Pattern of Statin-Induced Osteogenesis, *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 43, 46-50.