

Ekspresi BMP2 dan TRAF6 pada Jaringan Periodontal setelah Pemberian Ekstrak Kopi Robusta selama Pergerakan Gigi Ortodonti

(Expression of BMP2 and TRAF6 in Periodontal Tissue after Robusta Coffee Extract Administration during Orthodontic Tooth Movement)

Herniyati¹, Happy Harmono², Leliana Sandra Devi Ade Putri³, Hestieyonini Hadnyawati⁴

¹Bagian Ortodonsia, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

²Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

³Bagian Ortodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

⁴Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Masyarakat, Universitas Jember

e-mail: herny_is@yahoo.com

Abstract

Orthodontic tooth movement occurs due to mechanical stimulation followed by alveolar bone and periodontal ligament remodeling. Bone remodeling is the process of bone resorption in areas of tension and bone formation in areas of tension. Various techniques and drugs are used to speed up orthodontic treatment. This study aims to analyze the expression of BMP2 and TRAP6 on orthodontic tooth movement after administration of Robusta coffee extract. 24 wistar rats were divided into 4 groups : C1 (2 weeks) and C2 (3 weeks) groups: rats were given orthodontic mechanical force (OMF) and T1 (2 weeks) and T2 (3 weeks) groups rats were given OMF and Robusta coffee extract. OMF in rats was performed by moving the maxillary right permanent molars mesially with a Niti closed coil spring. Observations were made on the 15th and 22nd day by immunohistochemical examination to determine the expression of BMP2 and TRAP6. Administration of Robusta coffee extract for 2 weeks and 3 weeks increased BMP2 and TRAP6 expression ($p < 0.05$). Administration of Robusta coffee extract increased the expression of BMP2 and TRAP6 in the alveolar bone during orthodontic tooth movement.

Keywords: BMP2; TRAP6; omf; Robusta Coffee

Abstrak

Pergerakan gigi ortodonti terjadi karena adanya rangsangan mekanik yang diikuti dengan remodeling tulang alveolar dan ligamen periodontal Remodeling tulang adalah proses resorpsi tulang di daerah tekanan dan pembentukan tulang pada daerah tarikan. Berbagai macam teknik dan obat dilakukan untuk mempercepat perawatan ortodonti. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis ekspresi BMP2 dan TRAP6 pada pergerakan gigi ortodonti setelah pemberian ekstrak kopi Robusta. 24 ekor tikus wistar dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok K1 (2 minggu) dan K2 (3 minggu): tikus diberikan gaya mekanis ortodonti (GMO) dan kelompok P1(2 minggu) dan P2 (3 minggu): tikus diberikan GMO dan ekstrak kopi Robusta. GMO pada tikus dilakukan dengan menggerakkan gigi molar-1 permanen kanan RA ke mesial dengan Niti closed coil spring. Pengamatan dilakukan pada hari ke 15 dan ke 22 dengan pemeriksaan imunohistokimia untuk menentukan ekspresi BMP2 dan TRAP6 . Pemberian ekstrak kopi Robusta selama 2 minggu dan 3 minggu meningkatkan ekspresi BMP2 dan TRAP6 ($p < 0,05$). Ekspresi BMP2 dan TRAP6 pada hari ke 22 lebih besar dibandingkan hari ke 15 ($p < 0,05$) Pemberian ekstrak kopi Robusta efektif meningkatkan ekspresi BMP2 dan TRAP6 pada tulang alveolar selama pergerakan gigi ortodonti.

Kata kunci : BMP2, TRAP6 , GMO, Kopi Robusta

Pendahuluan

Pergerakan gigi ortodonti terjadi karena adanya rangsangan mekanik yang diikuti dengan remodeling tulang alveolar dan ligamen periodontal (PDL). Remodeling tulang adalah proses resorpsi tulang di daerah tekanan dan pembentukan tulang pada daerah tarikan. Resorpsi tulang dilakukan oleh osteoklas di sisi tekanan dan pembentukan tulang baru oleh osteoblas di sisi tarikan. Pada pergerakan gigi ortodonti gaya yang diterapkan pada gigi akan menyebabkan perubahan dalam lingkungan mikro sekitar PDL karena perubahan aliran darah, yang mengarah ke sekresi mediator inflamasi seperti sitokin, faktor pertumbuhan, neurotransmitter, colony-stimulating-faktor, dan metabolit asam arakidonat. Sebagai hasil dari sekresi ini, terjadi renovasi tulang [1].

Tumor-necrosis factor (TNF) *factor-related factor 6* (TRAF6) adalah satu-satunya anggota keluarga TRAF yang berpartisipasi dalam transduksi sinyal dari superfamili reseptor TNF (TNFR) dan *interleukin-1 receptor* (IL-1R) / *Toll-like receptor* (TLR) superfamili penting untuk kekebalan adaptif, kekebalan bawaan dan homeostasis tulang [2]. TRAF6 berhubungan dengan *cytoplasmic domain of RANK* yang merupakan molekul adaptor yang berperan penting dalam pembentukan osteoklas multinuklear [3,4].

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) termasuk BMP2 merupakan famili dari *growth factors* yang unik. *Growth factors* ini berperan dalam diferensiasi osteoblas yang mengatur proses pembentukan dan mineralisasi tulang. BMPs dikenal menstimulasi pembentukan tulang baru. BMP2 menstimulasi diferensiasi sel mesenkim menjadi osteoblas dan kondrosit. BMP2 mengikat reseptornya Ser/Thr kinase yang memfosforilasi dan mengaktifasi molekul sinyaling intraseluler Smad1 dan Smad5, proses ini mengakibatkan ekspresi faktor transkripsi Cbfa 1 (Runx2), yang menghasilkan ekspresi protein yang penting dalam pembentukan tulang [5].

Keberhasilan perawatan ortodonti dipengaruhi oleh sejumlah faktor, termasuk kesehatan periodontal, kebersihan mulut, dan kekuatan ortodonti. Upaya untuk mempercepat pergerakan gigi ortodonti telah dilakukan, antara lain dengan penggunaan obat-obatan [6].

Kopi merupakan salah satu minuman populer yang dikonsumsi kalangan masyarakat. Kopi antara lain mengandung zat yang disebut kafein (1,3,7 trimetilxantin) [7], asam klorogenat

dan asam kafeat, serta flavonoid yang mempunyai efek sebagai antioksidan [8]. Kopi robusta merupakan kopi yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi di banding kopi arabika dan lainnya [9]. Flavonoid merangsang aktivitas prolidase yang mana mengkatalisasi langkah terakhir kolagen dan memainkan peran penting dalam biosintesis kolagen melalui pensinyalan yang dimediasi integrin [10]. Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak kopi Robusta selama 2 minggu meningkatkan jumlah fibroblas dan kepadatan kolagen yang disebabkan karena kandungan kopi yang mempunyai efek antioksidan [11].

Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis peningkatan ekspresi BMP2 dan TRAF6 pada jaringan periodontal selama pergerakan gigi ortodonti setelah pemberian ekstrak kopi Robusta. Diharapkan, jika penelitian ini berhasil dapat dimanfaatkan sebagai alternatif terapi untuk mencegah terjadinya relaps ortodonti sehingga dapat memperpendek waktu perawatan ortodonti, selain efek samping minimal, mudah didapat dan harganya relatif murah.

Metode Penelitian

Penelitian eksperimental laboratories ini dilakukan dengan menggunakan 24 ekor tikus wistar jantan dengan rentang usia 3-4 bulan dan berat badan 250-300 gram. Tikus dalam keadaan sehat dan dipilih yang memiliki susunan gigi lengkap, kondisi rongga mulut dan jaringan periodontal yang sehat. Tikus dibagi secara random ke dalam 4 kelompok: kelompok kontrol (K1 dan K2): tikus diberikan gaya mekanis ortodonti dan 2ml aquades untuk waktu pengamatan selama 2 dan 3 minggu dan kelompok perlakuan (P1 dan P2): diberikan gaya mekanis ortodonti dan ekstrak beku kering (freeze dried extract) kopi Robusta sebesar 0,050 gram (setara dengan 1 cangkir kopi orang dewasa) yang dilarutkan dalam 2ml aquades, diberikan dua kali sehari yaitu pagi dan sore hari suntuk waktu pengamatan selama 2 dan 3 minggu.

Gaya mekanis ortodonti pada tikus dilakukan dengan cara tikus di anestesi menggunakan ketamin, Pada gigi molar-1 (M-1) rahang atas (RA) kanan dan pada kedua gigi insivus RA diberi kawat ligatur dengan diameter 0,20 mm. Kemudian M-1 RA kanan digerakkan ke mesial menggunakan Tension Gauge untuk menghasilkan kekuatan 3,5 oz = 10 grF dengan Nickel Titanium Orthodontic closed coil spring

panjang 6 mm[12]. Pengamatan dilakukan dengan cara tikus dikorbankan pada hari ke 15 dan ke 22, selanjutnya diambil gigi M1-1 dan M-2 RA kanan beserta jaringan periodontalnya. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan imunohistokimia untuk menentukan ekspresi BMP2 pada osteoblas daerah tarikan dan TRAP6 pada osteoklas daerah tekanan.

Data ekspresi BMP2, dan TRAF-6 dianalisis dengan menggunakan independent t test dan Mann Whitney test, dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Penelitian ini disetujui oleh komisi etik penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Nomor: 984/UN25.8/KEPK/DL/2020.

Hasil

Hasil Penghitungan ekspresi BMP2 pada osteoblas pada tulang alveolar

Hasil penelitian efek ekstrak kopi Robusta pada ekspresi BMP2 ditunjukkan pada Tabel 1. Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi BMP2 ditunjukkan pada Gambar 1

Tabel 1. Rerata ekspresi BMP2 pada hari ke 15 dan 22 dan analisis statistiknya

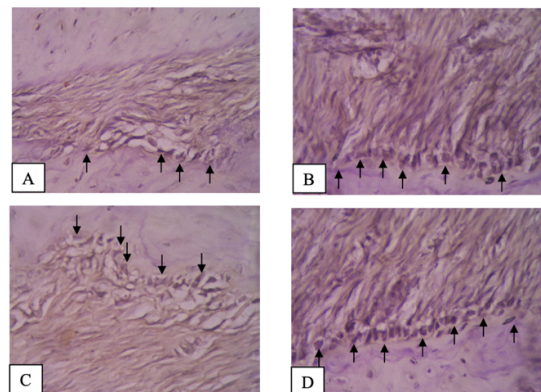
Kelompok	N	Ekspresi BMP2 (Rerata \pm SD)		P
		Hari ke- 15	Hari ke- 22	
Kontrol	6	6,967 \pm 0,314	8,1500 \pm 0,164	0,000*
Perlakuan	6	9,917 \pm 0,217	11,917 \pm 0,271	0,000*
p		0,000*	0,000*	

*p < 0.05 = signifikan

Pengujian berdasarkan independent t-test ekspresi BMP2 antar kelompok penelitian pada hari ke 15 maupun hari ke 22 menunjukkan bahwa ekspresi BMP2 pada kelompok perlakuan lebih besar dibandingkan pada kelompok kontrol dan terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$),

Pengujian berdasarkan independent t-test pada kelompok kontrol dan pada kelompok perlakuan menunjukkan bahwa ekspresi BMP2 pada kelompok K maupun kelompok P pada hari ke 22 lebih besar daripada hari ke 15 secara signifikan ($p < 0,05$), yang berarti terdapat peningkatan ekspresi BMP2 pada hari ke 22 secara bermakna.

Gambar histologi ekspresi BMP2 pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil pemeriksaan imunohistokimia, diamati pada pembesaran 400x. Ekspresi BMP2 pada tulang alveolar pengamatan hari ke 15 dan 22 ditunjukkan dengan tanda panah. A. kelompok Kontrol hari ke 15; B. kelompok Perlakuan hari ke 15; C. kelompok kontrol hari ke 22; D. kelompok Perlakuan hari ke 22.

Hasil Penghitungan ekspresi TRAF6 pada osteoklas pada tulang alveolar

Hasil penelitian efek ekstrak kopi Robusta pada ekspresi TRAP6 ditunjukkan pada Tabel 2

Tabel 2. Rerata ekspresi TRAP6 pada hari ke 15 dan 22 dan analisis statistiknya

Kelompok	n	Ekspresi TRAF6 (Rerata \pm SD)		P
		Hari ke- 15	Hari ke- 22	
Kontrol	6	1,4000 \pm 0,155	2,033 \pm 0,256	0,004*
Perlakuan	6	2,8000 \pm 0,219	3,2500 \pm 0,295	0,000*
p		0,002*	0,000*	

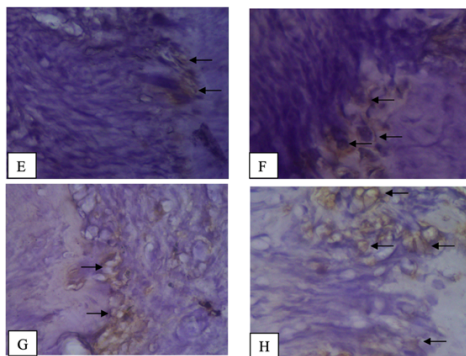
*p < 0.05 = signifikan

Pengujian berdasarkan Uji Mann-Whitney ekspresi TRAF6 antar kelompok penelitian pada hari ke 15 menunjukkan bahwa ekspresi TRAF6 pada kelompok perlakuan lebih besar dibandingkan pada kelompok kontrol dan terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

Pengujian berdasarkan independent t-test ekspresi TRAF6 antar kelompok penelitian pada hari ke 22 menunjukkan bahwa ekspresi TRAF6n pada kelompok perlakuan lebih besar dibandingkan pada kelompok kontrol secara signifikan ($p < 0,05$).

Pengujian berdasarkan berdasarkan Uji Mann-Whitney pada kelompok kontrol dan berdasarkan independent t-test pada kelompok perlakuan menunjukkan bahwa ekspresi TRAF6 pada kelompok K maupun kelompok P pada hari ke 22 lebih besar daripada hari ke 15 secara signifikan ($p < 0,05$), yang berarti terdapat peningkatan ekspresi TRAF6 pada hari ke 22 secara bermakna.

Gambar histologi ekspresi TRAP 6 pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2. Hasil pemeriksaan imunohistokimia, diamati pada pembesaran 400x Ekspresi TRAP6 pada tulang alveolar pengamatan hari ke 15 dan 22, ditunjukkan dengan tanda panah:
E. kelompok Kontrol hari ke 15;
F. kelompok Perlakuan hari ke 15;
G. kelompok Kontrol hari ke 22;
H. kelompok Perlakuan hari ke 22.

Pembahasan Ekspresi BMP2

BMP-2 seperti bone morphogenetic protein lainnya, memainkan peranan yang penting dalam tumbuh kembang tulang dan tulang rawan (kartilago), meliputi hedgehog pathway, TGF beta signaling pathway dan pada interaksi reseptor sitokin. BMP-2 merupakan BMP osteoinduktif, telah memperlihatkan potensinya menginduksi diferensiasi osteoblas pada berbagai tipe sel. Disamping itu juga dapat meningkatkan komponen selular dari ekspresi gen Id (inhibitor of differentiation) pada sel-sel osteoblas dan menaikkan ekspresi fenotip spesifiknya. Dalam penyembuhan luka, BMP-2

juga dapat merangsang kemotaksis dari monosit dan menstimulasi ekspresi mRNA TGF β -1. Selama penyembuhan fraktur, BMP-2 mempengaruhi sel-sel prekursor untuk menjadi kondroblas dan mengekspresikan protein-protein yang dibutuhkan untuk memproduksi anyaman tulang [13].

Remodeling tulang adalah proses siklus aktifitas seluler tulang, meliputi peristiwa resorpsi dan aposisi secara berurutan. Remodeling tulang terjadi setelah puncak masa pertumbuhan tulang tercapai. Remodeling tulang dimulai dari aktifitas osteoklas, yang mengakibatkan resorpsi dan selanjutnya diikuti aktifitas osteoblas untuk aposisi pembentukan tulang baru [14].

Diferensiasi osteoblas dicapai melalui ekspresi bersama dari sejumlah faktor transkripsi kunci, dan pembentukan tulang oleh osteoblas dikendalikan baik lokal dan sistemik. Diferensiasi dan fungsi osteoblas diatur oleh jalur sinyal protein morphogenetic tulang (BMP) [15,16]. Protein Smad heterodimeric mengontrol ekspresi RUNX-2, yang juga dikenal sebagai core binding factor alpha1 (cbfa1), adalah faktor transkripsi yang sangat diperlukan untuk diferensiasi osteoblas [17]. Jalur sinyal Kanonik Wnt sangat diperlukan untuk diferensiasi osteoblas selama skeletogenesis dan terus memiliki peran penting dalam osteoblas dewasa [18].

Peningkatan ekspresi BMP2 pada osteoblast setelah pemberian ekstrak kopi Robusta pada hari ke 15 maupun hari ke 22 disebabkan karena flavonoid yang terkandung dalam ekstrak kopi robusta meningkatkan osteogenesis /pembentukan osteoblas dengan meningkatkan BMP2 [19]. Flavonoid telah ditemukan untuk menurunkan ekskresi kalsium dan fosfat dalam urin, meningkatkan aktivitas osteoblas, menurunkan aktivitas osteoklas, dan melindungi dari hilangnya ketebalan trabekuler [20-22]. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa flavonoid turunan tumbuhan yang berbeda dapat merangsang fungsi osteoblas, dan menghambat fungsi osteoklas baik sendiri atau dalam kombinasi. Karena kejadian alami dan kurangnya efek samping, flavonoid dianggap lebih aman daripada terapi penggantian obat konvensional sebagai tindakan pencegahan terhadap berbagai penyakit termasuk osteoporosis [23].

Ekspresi BMP2 pada kelompok perlakuan pada hari ke 22 terjadi peningkatan dibandingkan hari ke 15 secara signifikan ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa semakin lama pemberian ekstrak kopi Robusta semakin besar ekspresi BMP2. BMP2 diekspresikan pada

osteoblas yang berperan dalam meningkatkan aposisi/pembentukan tulang pada proses remodeling tulang alveolar.

Ekspresi TRAF6

Diferensiasi osteoklas diawali dengan sinyal melalui c-fms, reseptor macrophage colony stimulating factor (M-CSF), dalam sel-sel prekursor mononuklear, yang meregulasi ekspresi RANK [24]. Peningkatan ekspresi TRAF6 pada osteoklas setelah pemberian ekstrak kopi Robusta pada hari ke 15 maupun hari ke 22 disebabkan karena kafein yang terkandung dalam ekstrak kopi Robusta meningkatkan osteoklastogenesis, [25,26]. Kafein meningkatkan diferensiasi dan pematangan osteoklas melalui aktivasi p38 MAP kinase, sehingga menginduksi ekspresi Mitf dan aktivasi transkripsi DC-STAMP, dan akhirnya CtsK dan TRAP [27]

Kafein memiliki kemampuan untuk meningkatkan osteoklastogenesis termediasi-RANKL yang diatur oleh COX-2/PGE(2) [28]. RANKL yang diproduksi oleh osteoblas selanjutnya mengikat Receptor activator of Nuclear Factor-kb (RANK) pada permukaan prekursor osteoklas dan merekrut protein adaptor tumour necrosis factor receptor-associated factor6 (TRAF6), yang menyebabkan aktivasi Nuclear factor-kappa B (NF-Kb) dan mentransmisikan ke nukleus. NF-Kb meningkatkan ekspresi c-Fos, dan C-Fos berinteraksi dengan NFATc1 untuk memicu transkripsi gen osteoklastogenik [29].

NFATC1 merupakan regulator utama RANKL yang menginduksi diferensiasi osteoklas dan memainkan peran penting dalam fusi dan aktivasi osteoklas melalui peningkatan regulasi berbagai gen yang bertanggung jawab untuk perlekatan osteoklas, migrasi, pengasaman, degradasi anorganik dan organik matriks tulang [30].

Ekspresi TRAP6 pada kelompok perlakuan pada hari ke 22 terjadi peningkatan dibandingkan hari ke 15 secara signifikan ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa semakin lama pemberian ekstrak kopi Robusta semakin besar ekspresi TRAP6. TRAP6 diekspresikan pada osteoklas yang berperan dalam meningkatkan resorpsi tulang pada proses remodeling tulang alveolar, sehingga pemberian ekstrak kopi Robusta dapat dijadikan bahan alternatif dalam mempercepat perawatan ortodonti.

Simpulan dan Saran

Pemberian ekstrak kopi Robusta selama 2 dan 3 minggu meningkatkan ekspresi BMP2 pada osteoblas dan ekspresi TRAF6 pada osteoklas. Semakin lama pemberian Ekstrak kopi Robusta semakin meningkatkan ekspresi BMP2 maupun ekspresi TRAF6, sehingga dapat dijadikan alternatif untuk meningkatkan proses remodeling tulang.

Daftar Pustaka

- [1] Nimeri G, Kau CH, Aboe-kheir NS, Corona R,. Acceleration of tooth movement during orthodontic treatment – a frontier in Orthodontic. *Prog Orthod*. 2013; (14): 14-42.
- [2] Te H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, et al. 2002. *Nature*. 2002; 418(6896), 443-447.
- [3] Bai S, Kitaura H, Zhao H, Chen J, Muller JM, Schule R, Darnay B, Novac DV, FP, Teitelbaum SL. FHL2 inhibits the activated osteoclast in a TRAF6-dependent manner. *J Clin Invest*. 2005; 115(10): 2742-2751
- [4]. Lamoyhe B, William K, Webster WK, Ambily K , Webster AK, Gopinathan A , Besse A, D Campos A, Bryant G Darnay BG. TRAF6 Ubiquitin Ligase is Essential for RANKL Signaling and Osteoclast Differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007; 359(4),1044-49,
- [5] Mundy GR, Chen D, and Oyajobi BO. Bone Remodeling, in *Prime on the Metabolic Diseases and Disorder of Mineral Metabolism*. Favus MJ ed, Washington DC: American Society of Bone and Mineral Research, 2003.
- [6] Shenava S, Nayak KUS, Bhaskar V, Nayak A. Accelerated Orthodontics-A Review. *IJSRP Journal*. 2014; 1(5): 35-39
- [7] Sukendro S. *Keajaiban Dalam Secangkir Kop*. Penerbit: Media Pressindo Yogyakarta; 2013.
- [8] Yashin, A., Y. Yashin, J.Y. Wang, dan B.S. Nemzer. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. *Antioxidants*. 2013; 11(2): 230-245.
- [9] Richelle MI, Tavazzi, Offord E.I. Comparison of the antioxidant of commonly consumed Polyphenole Beverage (Coffee, Cocoa, Tea) Prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49(70): 3438-3444
- [10] Galicka A, Nazaruk J. Stimulation of Collagen Biosynthesis by Flavonoid Glycosides in Skin Fibroblasts of Osteogenesis Imperfecta Type 1 and the

- Potential Mechanism of their action. *IJM Medicine*. 2007; (20): 889-895.
- [11] Herniyati, Putri LSD, Wijayanti RPA. Effects of Robusta coffee extract on Increasing fibroblast number and Density of Collagen Fibers of Periodontal Ligament in Orthodontic Tooth Movement. *Forkinas 2019*. Aston Hotel 6-7 September 2019.
- [12] Akhoundi MSA, Mehr MS , Keshvad MA, Moghaddam SE , Alaeddini M , Dehpour A , Mirhashemi AH Effect of amitriptyline on orthodontic tooth movement in rats: an experimental study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2020; 14(3): 147-152
- [13] Kim MK, and Niyibizi C. Interaction of TGF β -1 and rhBMP-2 on human bone marrow stromal cells cultured in collagen gel matrix. *Yonsei Med J* 2001.;42(3): 338-344.
- [14] Thailander B, Rygh P, and Reitan K. Tissue Reaction In Orthodontics. In *Orthodontics Current Principles And Techniques*. 3rd ed., St. Louis : Mosby; 2000.
- [15] Cao X and Chen D. The BMP Signalling and in Vivo Bone Formation. *Gene* . 2005.: (357): 1-8.
- [16] Day TF, Guo X, Garrett- Beal L and Yang Y. Wnt/beta Catenin Signalling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis, *Dev. Cell* . 2005: (8): 739-750.
- [17] DUCY P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, and Karsenty G.. *Osf2/Cbfa1: a Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation*. *Cell*. 1997: (89): 747-754.
- [18] Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, and Helfrich MH. Bone emodelling at a Glance, *J Cell*. 2011; (124): 991-998.
- [19] Mamun MA, Islam K, Alam MJ, Khatun A, Alam MM, Al-Bari MA, Alam MJ. Flavonoids isolated from *Tridax procumbens* (TPF) inhibit osteoclasts differentiation and bone resorption. *Biol Res*. 2015; (48): 51.
- [20] Mitra C, Das D, Das AS, Preedy VR. Black tea (*Camellia sinensis*) and bone loss protection. In: Preedy VR, editor. *Tea in health and disease prevention*. London: Academic Press; 2013.
- [21] Shen C-L, Yeh JK, Cao JJ, Chyu M-C, Wang J-S. Green tea and bone health: 22. Mamun MA, Islam K, Alam MJ, Khatun A, Alam MM, Al-Bari MA, Alam MJ. Flavonoids isolated from *Tridax procumbens* (TPF) inhibit osteoclasts differentiation and bone resorption. *Biol Res*. 2015; (48): 51.
- [22] Nash LA, Sullivan PJ, Peters SJ, Ward WE. Rooibos flavonoids, orientin and luteolin, stimulate mineralization in human osteoblasts through the Wnt pathway. *Mol Nutr Food Res*. 2015; (59): 443-53.
- [23] Haq MJ, Riaz M, Feo VD, Jaafar HZE. Moga M . *Rubus fruticosus L.: constituents, biological activities and health related uses*. *Molecules*. 2014; 19(8):10998-1029.
- [24] Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, and Helfrich MH. Bone Remodelling at a Glance, *J Cell*. 2011; (124): 991-998.
- [25] Jianru Y, Boxi Y, Meile L, Yu W, Wei Z, Yu L, and Zhihe Z. Caffeine may enhance orthodontic tooth movement through increasing osteoclastogenesis induced by periodontal ligament cells under compression. *Archives of Oral Biology*. 2016 (64): 51-60.
- [26] Herniyati. Pengaruh Kafein Terhadap Ekspresi RANKL dan Jumlah Osteoklas Pada Pergerakan Gigi Ortodonti. *Denta Jurnal Kedokteran Gigi*. 2016; 10(1): 62-70
- [27] Choi J, Choi SY, Lee SY, Lee JY, Kim HS, Lee SY, Lee NK. Caffeine enhances osteoclast differentiation and maturation through p38 MAP kinase/Mitf and DC-STAMP/CtsK and TRAP pathway. *Cell Signal*. 2013; 25(5): 1222-7.
- [28] Liu XH et al. Interactive effect of interleukin-6 and prostaglandin E2 on osteoclastogenesis via the OPG/RANKL/RANK system. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; (1068): 225-33.
- [29] Boyce, Brendan F.MD, and Lianping X.MD. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2007; 473(2):139-146.
- [30] Zhao Q, Wang Xi, Liu Y, He Aimin, Jia Ruokun. NFATc1: Functions in osteoclasts, *iJBCB*. 2010; 42(5): 579-576.