



**KADAR *PYRIDINOLINE* PADA SALIVA PENDERITA
PENYAKIT PERIODONTAL INFLAMATORIK**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Putri Kharisma Dewi

NIM 101610101090

**BAGIAN PATOLOGI KLINIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2014

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibu tercinta Nurhayatin dan Bapak terhebat Sutriyono yang telah membesarkan saya hingga saat ini;
2. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi yang memberikan ilmu tak ternilai harganya dengan tulus ikhlas;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;

MOTTO

Sesungguhnya Allah sekali-kali tidak akan mengubah sesuatu nikmat yang telah dianugerahkan-Nya kepada sesuatu kaum, hingga kaum itu mengubah apa yang ada pada diri mereka sendiri.

(Terjemahan Surat Al Anfaal Ayat 53)*

Anda membawa banyak kenikmatan dalam diri Anda, dan membawa pundi-pundi kebaikan yang Allah karuniakan kepada diri Anda. Bersyukurlah.**

Anda hanya sebesar yang mungkin bagi Anda. Janganlah berkata tidak mungkin bagi yang ingin Anda capai.***

* Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo

** Al-Qarni, A. 2008. *La Tahzan: Jangan Bersedih*. Jakarta: Qisthi Press.

*** Teguh, M. 2009. *Life Changer: Menjadi Pengubah Hidup*. Jakarta: Mario Teguh Publisher.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Putri Kharisma Dewi

NIM : 101610101090

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Kadar *Pyridinoline* pada Saliva Penderita Penyakit Periodontal Inflamatorik” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 27 Maret 2014

Yang menyatakan,

Putri Kharisma Dewi

NIM 101610101090

SKRIPSI

**KADAR *PYRIDINOLINE* PADA SALIVA PENDERITA
PENYAKIT PERIODONTAL INFLAMATORIK**

Oleh

Putri Kharisma Dewi

NIM 101610101090

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Kadar *Pyridinoline* pada Saliva Penderita Penyakit Periodontal Inflamatorik” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 27 Maret 2014

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Dosen Penguji Ketua,

Dosen Penguji Anggota,

Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes
NIP. 197005091999032001

drg. Hengky B. Ardhyanto, MDSc
NIP. 197905052005012001

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Pendamping,

drg. Agustin Wulan S.D., MDSc
NIP. 197908142008122003

Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001

Mengesahkan
Dekan,

drg. Hj. Herniyati, M. Kes
NIP. 195909061985032001

RINGKASAN

Kadar *Pyridinoline* pada Saliva Penderita Penyakit Periodontal Inflamatorik; Putri Kharisma Dewi, 101610101090; 2013: 64 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyakit periodontal masih menduduki urutan kedua utama dalam penyakit gigi dan mulut yang banyak diderita masyarakat Indonesia. Ketika terjadi inflamasi periodontal, kolagen akan terdegradasi dan *pyridinoline* akan terurai serta disekresikan ke dalam cairan krevikular gingiva dan saliva. *Pyridinoline* merupakan tripeptida yang berperan pada ikatan silang kolagen tipe I yang banyak terdapat pada jaringan periodontal. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis kadar *pyridinoline* pada saliva penderita penyakit periodontal inflamatorik.

Penelitian ini adalah penelitian observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Subyek penelitian adalah pasien RSGM Universitas Jember yang menderita penyakit periodontal inflamatorik dengan kriteria inklusi wanita usia 30-50 tahun dan memiliki gigi minimal 20 gigi, serta kriteria eksklusi memiliki kelainan atau penyakit sistemik, memiliki kebiasaan merokok, menggunakan obat kumur, antibiotik, atau obat-obatan minimal 6 bulan terakhir, sedang dalam perawatan periodontal 6 bulan terakhir, sedang hamil, menyusui, menstruasi, menggunakan gigi tiruan, sedang mengalami mukositis, karies media, karies profunda, maupun karies profunda perforasi. Pemeriksaan inflamasi periodontal didasarkan pada Periodontal Indeks modifikasi Russel. Jumlah subyek penelitian sebesar 15 orang yang terdiri dari tiga kelompok, yaitu kelompok gingivitis, awal penyakit periodontal, dan penyakit periodontal destruktif. Subyek penelitian diminta mengumpulkan saliva di dalam rongga mulut tanpa stimulus, kemudian mengeluarkan ke dalam pot saliva. Kadar *pyridinoline* saliva diukur menggunakan LC-MS/MS. Data dianalisis menggunakan uji *One-way Anova*.

Hasil penelitian menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan kadar *pyridinoline* saliva pada kelompok gingivitis, awal penyakit periodontal, dan penyakit periodontal inflamatorik ($p>0,05$).

Kesimpulan dalam penelitian ini adalah kadar *pyridinoline* saliva tidak dapat menunjukkan tingkat keparahan kerusakan jaringan pada penyakit periodontal inflamatorik.

PRAKATA

Alhamdulillahirobbil'alamin. Segala puji bagi Allah SWT yang telah mengulurkan tangan terindah-Nya serta shalawat kepada penuntun umat terbaik Nabi Muhammad SAW sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Kadar *Pyridinoline* pada Saliva Penderita Penyakit Periodontal Inflamatorik”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih yang tiada terhingga kepada:

1. drg. Hj. Herniyati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. drg. Rahardyan P., M.Kes., Sp.Prost., selaku Pembantu Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. drg. Agustin Wulan Suci D., MDSc selaku dosen Pembimbing Utama (DPU) dan Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes selaku Dosen Pembimbing Pendamping (DPP), yang telah memberikan banyak ilmu, saran, masukan, dan sumbangan pemikiran yang sangat berharga dalam penyusunan skripsi ini;
4. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes selaku Dosen Penguji Utama dan drg. Hengky Bowo Ardhyanto, MDSc selaku Dosen Penguji Anggota, yang telah memberikan banyak kritik dan saran serta ilmu untuk kesempurnaan skripsi ini;
5. drg. Tecky Indriana, M.Kes dan Prof. drg. Mei Syafriadi, MDSc. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan arahannya selama menempuh pendidikan dokter gigi;

6. Ibu dan Bapak tercinta yang selama ini selalu mendoakan dengan tulus, cinta, memberikan kekuatan, semangat, dan dukungan, bahkan ketika berada di titik terlemah;
7. Adikku tersayang, Nurdwiansyah Triyono Putra, yang memberikan keceriaan dan semangat tanpa diminta;
8. Subyek penelitian yang telah membantu sehingga skripsi ini dapat terwujud. Terima kasih untuk saliva yang sangat berharga, Bu;
9. Pak Kaliawan dari Laboratorium Kimia Analisis Instrumentasi Fakultas Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang, terima kasih telah banyak membantu dan memberikan ilmu yang bermanfaat dalam penelitian ini;
10. Teman-teman seperjuangan “Salivah”, Nanda Afnita, Rangga Diputra, dan Nirmala Maulida K. Terima kasih untuk perjuangan skripsi yang penuh warna bersama kalian, terima kasih untuk bantuan dan semangatnya hingga skripsi ini selesai;
11. Teman-teman “Wisma Selebriti”, Ifa, Nadia, Viny, Like, dan teman-teman kos lain yang telah memberikan semangat, dukungan dan bantuan selama pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi maupun selama penyelesaian skripsi ini;
12. Ibu kos, Ibu Nurhasanah, yang sangat perhatian dan bersedia menampung, merawat, dan melindungi anak kosnya dengan tulus;
13. Jaenal Arifin, terima kasih telah menjadi penghibur disaat sedih, penyemangat disaat lelah, dan terima kasih untuk bantuannya selama saya menuntut ilmu;
14. Sahabat yang baik, Syamsinar, terima kasih untuk dukungan, bantuan, dan semangat selama ini. Tiada orang sempurna, begitu pula saya;
15. Hastin, Diah, Haninah, Nur Lely, dan semua teman-teman angkatan 2010, terima kasih untuk persahabatan yang mantab, dukungan dan semangat saat saya tak bisa melakukan apapun, dan bantuan selama menempuh pendidikan.

Semoga persaudaraan kita semua tetap terjaga hingga nanti kita menempuh jalan masing-masing;

16. Sahabat yang baik, Ajeng Santiara, terima kasih banyak untuk bantuannya dalam penelitian dan memperkenalkan saya dengan Pak Kaliawan. Tanpa takdir itu, penelitian saya tidak akan berarti apa-apa;
17. Sahabat jauh yang begitu berharga, Septi Maulia yang banyak memberi motivasi dan doa selama ini. Terima kasih untuk persahabatan yang indah;
18. drg. Ali Taqwim, terima kasih telah mengajarkan saya menulis dan memperkenalkan dunia menulis yang menyenangkan. Terima kasih untuk ilmu yang sangat berguna;
19. Semua pihak yang telah membantu hingga terselesaikannya skripsi ini.

Penulis sadar masih banyak ketidaksempurnaan dalam penulisan skripsi ini. Kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi kesempurnaan penulisan selanjutnya. Akhirnya, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua. Amin.

Jember, 27 Maret 2014

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN SKRIPSI	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan dan Manfaat Penulisan	3
1.3.1 Tujuan Penulisan.....	3
1.3.2 Manfaat Penulisan.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Pyridinoline	4
2.2 Kolagen Tipe I	9
2.3 Penyakit Periodontal Inflamatorik	12
2.4 Saliva	15
2.5 Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry	16

2.6 Kerangka Konsep	19
2.7 Hipotesis	20
BAB 3. METODE PENELITIAN	20
3.1 Jenis Penelitian	21
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.3 Subyek Penelitian	21
3.4 Identifikasi Variabel	22
3.4.1 Variabel Bebas	22
3.4.2 Variabel Tergantung	22
3.5 Alat dan Bahan Penelitian	23
3.5.1 Alat Penelitian	23
3.5.2 Bahan Penelitian	23
3.6 Prosedur Penelitian	23
3.6.1. <i>Ethical Clearance</i>	23
3.6.2. Pemeriksaan Rongga Mulut	24
3.6.3. Pengambilan Sampel Saliva	25
3.6.3. Pengukuran Kadar <i>Pyridinoline</i>	26
3.7 Analisis Data	27
3.8 Alur Penelitian	28
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Hasil Penelitian	29
4.2 Pembahasan	30
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Kriteria dan Skor Periodontal Indeks modifikasi Russel	24
3.2 Kriteria Klinis Periodontal Indeks modifikasi Russel.....	25
3.3 Klasifikasi Karies	25
4.1 Deskripsi Subyek Penelitian	29

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur Kimia <i>Pyridinoline</i>	4
2.2 Letak <i>Pyridinoline</i> pada Kolagen	5
2.3 Pembentukan <i>Pyridinoline</i> secara Enzimatik.....	6
2.3 Sintesis Kolagen Tipe I.....	11
2.4 Prinsip Kerja LC-MS/MS	18
2.5 Kerangka Konsep	19
3.1 Alur Penelitian	28
4.1 Rata-rata Kadar <i>Pyridinoline</i> pada Saliva Penderita Penyakit Periodontal Inflamatorik	29

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

A. <i>Ethical Clearance</i>	41
B. Surat Pernyataan Kesiediaan Subyek Penelitian (<i>Informed Consent</i>)	42
C. Kuesioner Subyek Penelitian	43
D. Blanko Penelitian	44
E. Data Hasil Penelitian Kadar <i>Pyridinoline</i> pada Saliva Penderita Penyakit Periodontal Inflamatorik.....	45
F. Analisis Data	46
B.1. Uji Normalitas <i>Kolmogorov-Smirnov</i>	46
B.2. Uji Homogenitas <i>Levene</i>	46
B.3. Uji Statistik <i>One-Way Anova</i>	46
G. Rekapitulasi Perhitungan Pengukuran Standar <i>Pyridinoline</i>	47
H. Rekapitulasi Perhitungan Pengujian Sampel <i>Pyridinoline</i>	48
I. Kurva Standar <i>Pyridinoline</i>	49
J. Kurva <i>Pyridinoline</i> pada Saliva Penderita Penyakit Periodontal	52
K. Foto Penelitian	56

DAFTAR SINGKATAN

ELISA	=	<i>enzyme-linked Immunosorbent assay</i>
HESI	=	<i>high electrospray ionisation</i>
HPLC	=	<i>high performance liquid chromatography</i>
IL-1 β	=	interleukin-1 β
IL-6	=	interleukin-6
LC-MS/MS	=	<i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
MMPs	=	matriks metaloproteinase
MT-MMPs	=	<i>membrane-type</i> matriks metaloproteinase
PGE ₂	=	prostaglandin E ₂
PI modifikasi Russel	=	periodontal indeks modifikasi Russel
SIM	=	<i>selected ion monitoring</i>
TIMPs	=	<i>tissue inhibitor matrix protease</i>
TNF- α	=	<i>tumor necrosis factor-α</i>
UHPLC	=	<i>ultra high performance liquid chromatography</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit periodontal merupakan salah satu penyakit gigi dan mulut yang banyak diderita masyarakat dunia. Prevalensi penyakit periodontal mencapai 50% dari jumlah populasi dewasa. Di Indonesia, penyakit ini menduduki urutan kedua utama dalam masalah kesehatan masyarakat (Wahyukundari, 2009). Penyakit ini dapat menyebabkan kegoyangan gigi dan akhirnya berakibat pada tanggalnya gigi (Suwandi, 2010).

Penyakit periodontal disebabkan oleh bakteri plak. Bakteri plak pada rongga mulut menyebabkan inflamasi pada jaringan periodontal. Adanya inflamasi periodontal akan memicu degradasi kolagen (Newman *et al.*, 2006; Serio dan Duncan, 2009). Sejumlah penelitian menyatakan bahwa untuk mendegradasi kolagen, ikatan silang pada kolagen harus terpecah terlebih dahulu (Thorpe, 2010). Setelah ikatan silang terdegradasi, kolagen akan terurai dan akhirnya terjadi kerusakan jaringan periodontal.

Pyridinoline merupakan tripeptida yang berperan pada ikatan silang kolagen tipe I. Kolagen tipe I merupakan kolagen yang banyak menyusun jaringan periodontal. *Pyridinoline* berfungsi untuk menstabilkan dan memperkuat struktur kolagen (Tanimoto *et al.*, 2003). *Pyridinoline* dibentuk selama maturasi kolagen. *Pyridinoline* tidak dimetabolisme oleh tubuh dan tidak dipengaruhi oleh diet. Ketika terjadi degradasi kolagen pada jaringan periodontal, *pyridinoline* juga akan terurai, kemudian akan dilepas ke cairan krevikular gingiva dan saliva (Thomas, 2012).

Banyak penelitian yang telah menggunakan *pyridinoline* sebagai penanda degradasi kolagen pada penyakit-penyakit sistemik, seperti osteoporosis, *rheumathoid arthritis*, dan beberapa penyakit kelainan metabolisme tulang yang

lain (Arıcan *et al.*, 2004). Penelitian Istok *et al.* (2001) menunjukkan peningkatan kadar *pyridinoline* urin seiring dengan pergantian kolagen pada penderita sklerosis sistemik. Penelitian Tanimoto *et al.* (2004) menyatakan bahwa terdapat perbedaan kadar *pyridinoline* urin pada penderita osteoartritis sendi temporomandibula dengan subyek-subyek kontrol yang tidak mengalami osteoartritis, kadarnya lebih tinggi pada penderita osteoartritis sendi temporomandibula.

Di bidang kedokteran gigi *pyridinoline* juga telah diuji untuk deteksi penyakit-penyakit pada rongga mulut. Penelitian Springer *et al.* (2003) tentang kadar *pyridinoline* urin pada skuamous sel karsinoma oral menyatakan bahwa terdapat perbedaan rata-rata kadar *pyridinoline* urin pada subyek sehat, pasien dengan skuamous karsinoma rekuren, pasien skuamous karsinoma tanpa melibatkan infiltrasi tulang mandibula, dan pasien skuamos karsinoma dengan keterlibatan infiltrasi tulang mandibula. Penelitian Oates *et al.* (2004) menunjukkan kadar *pyridinoline* cairan krevikular gingiva di sekitar implan pada pasien merokok lebih tinggi dibanding non perokok. Meskipun beberapa penelitian telah melaporkan hubungan *pyridinoline* dengan penyakit di rongga mulut, tetapi penelitian *pyridinoline* dalam kaitannya dengan penyakit periodontal inflamatorik belum banyak dilaporkan.

Terkait dengan penyakit periodontal inflamatorik, bahan biologis yang banyak digunakan untuk evaluasi inflamasi periodontal selama ini adalah cairan krevikular gingiva. Cairan krevikular gingiva banyak digunakan untuk evaluasi penyakit periodontal inflamatorik karena mengandung serum dan bahan-bahan lokal, seperti mediator inflamasi, sel-sel inflamasi, dan produk pemecahan jaringan. Cairan krevikular gingiva dapat menunjukkan kerusakan lokal di jaringan periodontal sehingga lebih spesifik (Armitage, 2004). Namun, cairan krevikular gingiva berjumlah sedikit dan sulit dalam pengambilannya (Zia *et al.*, 2011). Oleh karena itu, perlu dikembangkan bahan biologis lain, misalnya saliva.

Pemanfaatan saliva sebagai bahan deteksi penyakit pada rongga mulut memiliki banyak kelebihan. Saliva selalu tersedia, mudah didapat dan mudah

diambil tanpa peralatan khusus (Kashu *et al.*, 2012). Saliva dapat diperoleh dengan cepat tanpa rasa sakit dan dinilai lebih mudah dan aman pengambilannya (Prihartanti, 2002).

Pyridinoline saliva dan hubungan dengan penyakit periodontal inflamatorik belum banyak diteliti. Oleh karena itu, peneliti ingin menganalisis kadar *pyridinoline* saliva pada penderita penyakit periodontal inflamatorik.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, masalah yang dapat dirumuskan dalam penelitian ini adalah apakah ada perbedaan kadar *pyridinoline* saliva pada berbagai tingkat keparahan inflamasi periodontal?

1.3. Tujuan dan Manfaat

1.3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji perbedaan kadar *pyridinoline* saliva pada berbagai tingkat keparahan inflamasi periodontal.

1.3.2. Manfaat Penelitian

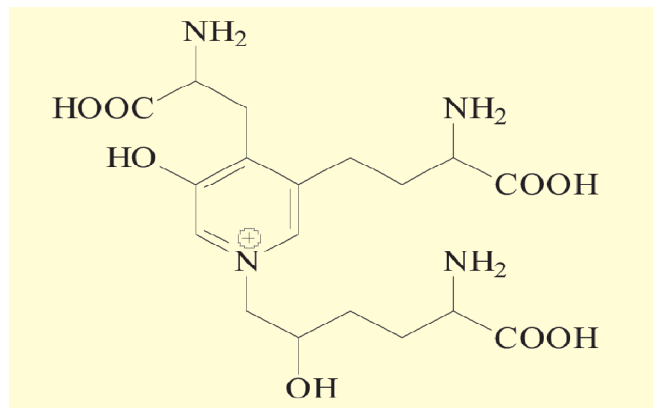
Manfaat dari penelitian ini di bidang kesehatan adalah sebagai berikut.

1. Memberi informasi ilmiah mengenai kadar *pyridinoline* pada saliva penderita penyakit periodontal inflamatorik.
2. Memberi informasi ilmiah mengenai kadar *pyridinoline* saliva sebagai alternatif penanda degradasi kolagen pada penyakit periodontal inflamatorik.
3. Sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

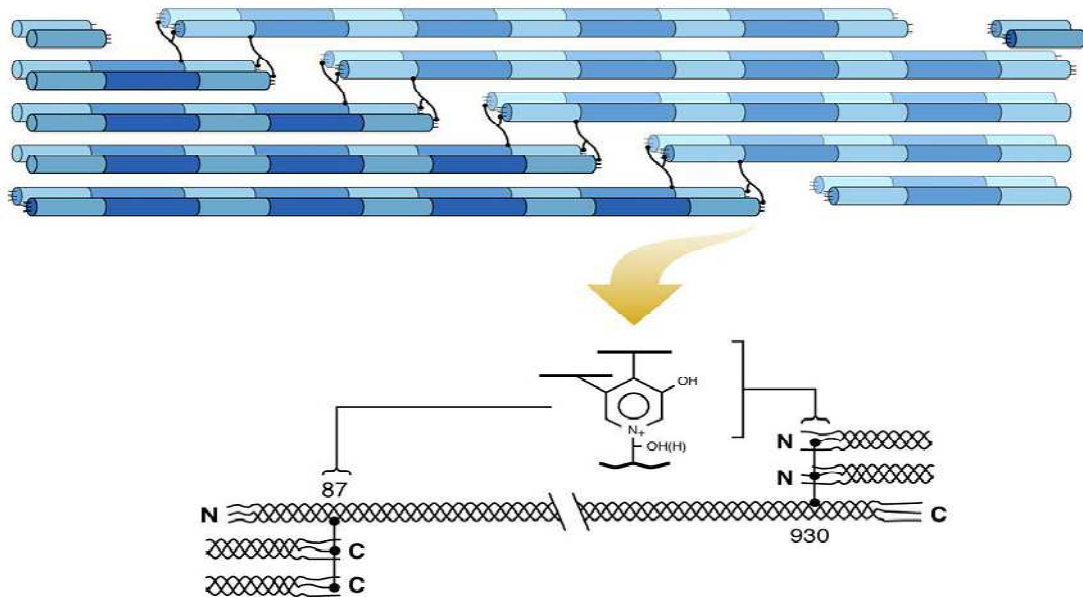
2.1. *Pyridinoline*

Pyridinoline atau *hydroxylysylpyridinoline* adalah tripeptida pada ikatan silang fibril kolagen. *Pyridinoline* terdapat pada jaringan lunak, tulang, kartilago, tendon, dan ligamen (Tanimoto *et al.*, 2003). *Pyridinoline* tidak dipengaruhi oleh *intake* makanan (Husain *et al.*, 1999). Ketika kolagen terdegradasi, *pyridinoline* diekskresi melalui urin, darah, maupun cairan krevikular gingiva dan saliva tanpa dimetabolisme (Istok *et al.*, 2001).



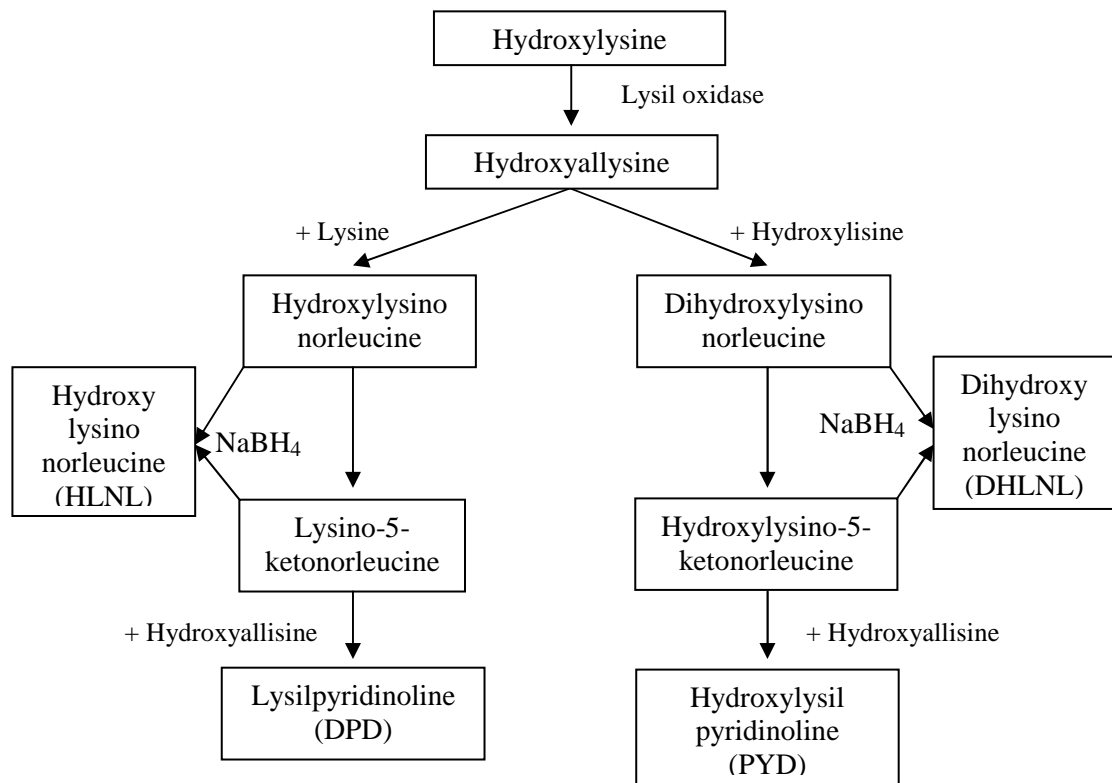
Gambar 2.1. Struktur Kimia *Pyridinoline* Berupa Tripeptida (Sumber: Vesper, 2005)

Pyridinoline merupakan ikatan silang yang spesifik pada kolagen tipe I (Tanimoto *et al.*, 2003). *Pyridinoline* berfungsi untuk menstabilkan dan memperkuat keseluruhan struktur kolagen. Tanpa pembentukan ikatan silang ini, fibril kolagen tidak akan berfungsi (Berkovitz *et al.*, 1995). *Pyridinoline* berupa ikatan trifungsional pada kolagen. *Pyridinoline* mengikat kolagen secara intermolekul. *Pyridinoline* memiliki tiga gugus fungsi yang mengikat dua amino terminal atau karboksi terminal dan satu *triple helix* kolagen.



Gambar 2.2. Letak *Pyridinoline* pada Kolagen (Sumber: Bush, 2013)

Pyridinoline dibentuk selama maturasi kolagen (Tanimoto *et al.*, 2003; Robins, 1994). *Pyridinoline* dibentuk melalui dasar ikatan silang hidroksiallisin (Berkovitz *et al.*, 1995). Sekali serat kolagen telah terbentuk di lingkungan ekstraseluler, ia akan distabilkan oleh pembentukan ikatan silang. Proses ikatan silang kolagen diawali oleh perubahan residu hidroksilisil menjadi aldehid melalui aksi lisil oksidase. Enzim ini melakukan deaminasi oksidatif grup ϵ -amino pada sisi rantai hidroksilisil sehingga menghasilkan aldehid, yaitu hidroksiallisin. Selanjutnya, hidroksiallisin dikondensasi dengan hidroksilisil sehingga menghasilkan ikatan silang divalen imatur, yaitu hidroksilisilino-5-ketonorleusin. Karena komponen tersebut tidak stabil, keduanya distabilkan oleh reduksi dengan borohidrid untuk membentuk dihidroksilisilnonorleusin. Ikatan silang divalen yang akan menstabilkan serat kolagen imatur ini selanjutnya bereaksi dengan grup aldehid telopeptida lain untuk membentuk ikatan silang piridinium trivalen, yaitu *pyridinoline* (Carrin *et al.*, 2006).



Gambar 2.3. Pembentukan *pyridinoline* secara enzimatik (Sumber: Carrin *et al.*, 2006)

Pyridinoline adalah salah satu tanda adanya kerusakan kolagen. *Pyridinoline* dapat digunakan sebagai indikator biologis dalam deteksi dini suatu penyakit yang berhubungan dengan kerusakan kolagen, seperti osteoporosis, osteoarthritis, diabetes melitus, penyakit periodontal, dan kanker (Kraenzelin *et al.*, 2008). *Pyridinoline* tidak dimetabolisme oleh tubuh dan merupakan produk degradasi kolagen tipe I. Ikatan silang ini dapat dideteksi dan dianalisis menggunakan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Robins, 1994), dan *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) (Kindt *et al.*, 2000).

Sama halnya dengan analisis klinis yang lain, analisis *pyridinoline* memiliki variabel-variabel yang mempengaruhi saat analisis maupun sebelum analisis. Namun, hal ini tidak menyebabkan *pyridinoline* menjadi tanda kerusakan kolagen

yang bias. Variabel-variabel yang mempengaruhi dapat dikurangi dengan pengumpulan sampel pada waktu-waktu yang spesifik dan mengendalikan kesamaan status subyek penelitian pada masing-masing sampel. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi ini harus diminimalkan untuk aplikasi klinik yang optimal (Vesper *et al.*, 2002). Faktor-faktor yang telah dilaporkan dapat mempengaruhi kadar *pyridinoline* adalah sebagai berikut.

a. Pengaruh umur

Selama masa anak-anak dan remaja, kadar *pyridinoline* berhubungan dengan pertumbuhan, dengan kadar tertinggi pada awal kelahiran. Kadar *pyridinoline* menurun dengan cepat dan akan konstan selama masa anak-anak, meningkat lagi selama pubertas, dan kemudian menurun serta sangat rendah selama masa dewasa (Vesper, 2005).

Beberapa penelitian menyatakan bahwa perubahan kadar *pyridinoline* pada wanita berumur 20-50 tahun cukup kecil. Perubahan kadarnya maksimal sekitar 10-15% dengan konsentrasi tertinggi sekitara umur 20-29 tahun. Jika rentang umum dieksklusi, maka tidak terdapat perubahan yang signifikan pada umum 30-50 tahun. Penelitian yang menganalisis perubahan kadar *pyridinoline* pada wanita premenopause dan *post* menopause menyatakan bahwa kadarnya lebih tinggi 30-55% pada wanita *post*menopause. Setelah menopause, perubahan ekskresi *pyridinoline* cukup kecil dengan sedikit peningkatan sekitar 8-15% selama umur 50-80 tahun (Vesper *et al.*, 2002).

b. Pengaruh jenis kelamin

Kadar *pyridinoline* lebih tinggi pada perempuan. Perempuan mengalami peningkatan kadar pada awal menopause dan selama fase *post* menopause. Sedangkan kadar pada laki-laki tetap konstan hingga umur 60 tahun (Vesper, 2005). Setelah umur 60 tahun, kadarnya dilaporkan meningkat sekitar 20-35% (Vesper *et al.*, 2002).

c. Pengaruh hamil dan menyusui

Selama masa kehamilan, kadar *pyridinoline* memuncak, utamanya selama trimester ketiga. Kadarnya dua hingga tiga kali lebih tinggi daripada wanita yang tidak hamil (Vesper *et al.*, 2002). Pada wanita menyusui kadar *pyridinoline* juga meningkat, utamanya pada bulan-bulan pertama menyusui (Vesper, 2005).

d. Pengaruh variasi musim

Kadar *pyridinoline* meningkat selama musim dingin dan menurun selama musim panas. Pengaruh faktor ini sangat kecil (Vesper, 2005). Beberapa penelitian juga menyatakan bahwa perubahan kadar hanya berkisar 5-25%, bahkan ada yang menyatakan tidak ada perbedaan yang signifikan pada perbedaan musim (Vesper *et al.*, 2002).

e. Pengaruh aktivitas fisik

Beberapa studi menyebutkan bahwa terdapat peningkatan kadar *pyridinoline* pada pasien dengan *bedrest* yang cukup lama (Vesper, 2005). Peningkatan ekskresi *pyridinoline* juga dilaporkan dalam penelitian efek lari, tapi tidak disebutkan signifikan atau tidak. Perubahan ekskresi *pyridinoline* juga didapatkan pada penelitian orang yang telah berolahraga, seperti *gym* dan *aerobic*. Namun, pengaruh faktor ini sangat kecil (Vesper *et al.*, 2002).

f. Pengaruh diet

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa tidak terdapat perubahan kadar *pyridinoline* setelah konsumsi suplemen pottasium, magnesium, fosfat, zink, dan susu. Tetapi, penelitian lain menyatakan bahwa konsumsi suplemen kalsium dapat menurunkan ekskresi *pyridinoline* pada wanita dan laki-laki. Perubahannya sekitar 33%. Peningkatan kadar *pyridinoline* dilaporkan terjadi pada orang yang mengonsumsi alkohol (Vesper *et al.*, 2002).

g. Pengaruh medikasi

Medikasi dapat mempengaruhi kadar *pyridinoline*. Peningkatan kadar dilaporkan terjadi pada pengguna obat-obat kortikosteroid (Vesper, 2005).

h. Pengaruh penyakit

Penyakit-penyakit yang dapat mempengaruhi kadar *pyridinoline* adalah diabetes melitus, hiperparatiroid, hipertiroid, kanker, osteoporosis dan penyakit-penyakit tulang lainnya (Vesper, 2005).

i. Pengaruh siklus sirkadian

Perubahan kadar *pyridinoline* terjadi selama sehari dengan puncaknya pada pagi hari dan menurun pada sore hari. Namun, hal ini dilaporkan hanya berpengaruh kecil (Vesper, 2005).

j. Pengaruh sebelum analisis terhadap sampel dan kalibrator

Pyridinoline sangat sensitif terhadap sinar ultraviolet. Sinar ultraviolet dapat mendegradasi *pyridinoline* dan mengalami puncak degradasi pada 6 jam setelah terpapar. Oleh karena itu, sampel tidak boleh terkena cahaya matahari sebelum dianalisis (Vesper, 2005; Vesper *et al.*, 2002).

2.2. Kolagen Tipe 1

Kolagen adalah famili protein ekstraseluler yang terikat erat dan merupakan komponen utama dalam jaringan ikat, memberikannya kekuatan serta fleksibilitas (Dorland, 2010). Kolagen merupakan protein terbanyak dalam tubuh manusia, yaitu sebesar 30% (Junqueira dan Carneiro, 2007). Sedikitnya terdapat 25 tipe kolagen. Kolagen tipe I adalah kolagen fibrilar yang termasuk dalam kolagen pembentuk fibril yang paling banyak ditemukan di dalam tubuh (Dorlan, 2010).

Semua tipe kolagen memiliki struktur *triple helix* (Murray *et al.*, 2009). Kolagen dibentuk oleh tiga rantai polipeptida (rantai α) yang membentuk struktur *triple helix* (Carrin *et al.*, 2006). Kolagen dibentuk oleh asam amino glisin (33,5%), prolin (12%), dan hidroksiprolin (10%). Asam amino tersebut membentuk struktur berulang yang dituliskan sebagai $(\text{Gly-X-Y})_n$. Unit protein yang berpolimerisasi membentuk serat kolagen adalah molekul panjang yang disebut tropokolagen, dengan panjang 280 nm dan lebar 1,5 nm. Tropokolagen

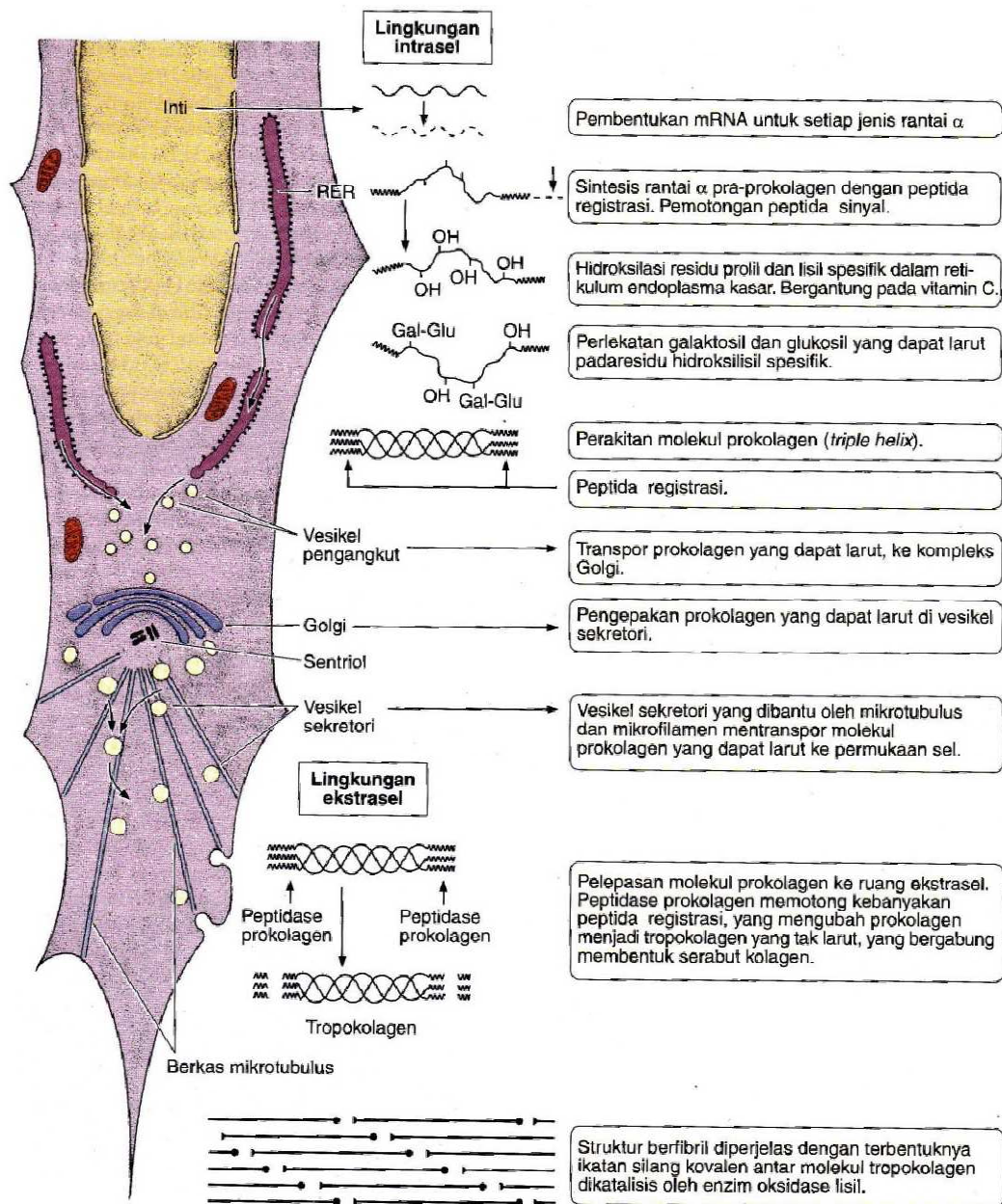
terdiri atas 3 rantai subunit polipeptida yang membentuk *triple helix* (pilinan rangkap 3) (Junqueira dan Carneiro, 2007).

Kolagen tipe I matang mengandung sekitar 1000 asam amino (Murray *et al.*, 2009). Pada kolagen tipe I, batang-batang tropokolagen berikatan membentuk fibril atau serabut. Molekul tropokolagen bergabung dalam subunit mikrofibrilar yang membentuk fibril (serabut). Ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik penting dalam pengelompokan dan pengepakan unit-unit ini. Struktur ini diperkuat dengan pembentukan ikatan silang kovalen, yakni suatu proses yang dikatalisis oleh aktivitas enzim lisil oksidase (Junqueira dan Carneiro, 2007).

Sintesis kolagen berlangsung dalam beberapa tahap, yang diringkas sebagai berikut (Junqueira dan Carneiro, 2007).

1. Rantai polipeptida α dirakit pada poliribosom yang terikat dan dimasukkan ke dalam sisterna sebagai molekul praprokolagen.
2. Peptida sinyal diputuskan sehingga membentuk prokolagen. Selanjutnya terjadi hidroksilasi prolin dan lisin.
3. Glikosilasi hidroksilisin berlangsung setelah hidroksilasi terjadi.
4. Setiap rantai α disintesis dengan panjang peptida ekstra yang disebut peptida registrasi pada ujung terminal amino dan karboksil. Prokolagen ditranspor dalam bentuk ini keluar dari sel ke lingkungan ekstrasel.
5. Di luar sel, protease spesifik yang disebut peptidase prokolagen akan memindahkan peptida registrasi. Prokolagen yang telah dipotong peptida registrasinya disebut tropokolagen. Residu hidroksiprolin ikut memelihara stabilitas tropokolagen heliks tripel dan membentuk ikatan hidrogen di antara rantai polipeptidanya.
6. Serabut kolagen menyatu membentuk serat. Proteoglikan dan glikoprotein struktural berperan penting pada agregasi tropokolagen untuk membentuk serabut dan pada pembentukan serat dari serabut.

7. Struktur berserat diperkuat dengan terbentuknya ikatan silang kovalen diantara molekul tropokolagen. Proses ini dikatalisis oleh kerja enzim oksidase lisil, yang juga bekerja di ruang ekstrasel.



Gambar 2.4. Sintesis Kolagen Tipe I (Sumber: Junqueira dan Carneiro, 2007)

Kolagen tipe I banyak ditemukan di jaringan ikat, tulang, ligamen, tendon, kornea, dan dermis (Gelse *et al.*, 2003). Kolagen tipe I juga banyak ditemukan di jaringan periodontal. Protein gingiva terdiri dari 50% kolagen dan kolagen yang terdapat di gingiva adalah kolagen tipe I, III, dan V. Ligamen periodontal dibentuk oleh 80% kolagen tipe I. Sementum dan tulang alveolar dibentuk oleh kolagen tipe I dengan jumlah 90% (Wilson dan Kornman, 1996).

Kolagen berfungsi untuk menjaga integritas struktural jaringan dan organ. Kolagen juga berperan penting selama perkembangan organ, proses penyembuhan luka, dan penyembuhan jaringan (Gelse *et al.*, 2003). Fungsi primer kolagen tipe I adalah memberi dukungan mekanis untuk struktur matriks ekstraseluler dari jaringan ikat serta memberi karakteristik bentuk pada jaringan tersebut dan menjaga integritas seluler di dalam matriks ekstraseluler (Xiong, 2008).

2.3. Penyakit Periodontal Inflamatorik

Penyakit periodontal adalah sekelompok penyakit yang mempengaruhi jaringan penyangga gigi (Bullon *et al.*, 2007). Sebagian besar penyakit ini disebabkan oleh inflamasi sehingga banyak disebut sebagai penyakit inflamasi. Jaringan periodontal adalah jaringan penyangga gigi yang meliputi gingiva, sementum, ligamen periodontal, dan tulang alveolar. Penyakit periodontal merupakan respon inflamasi terhadap bakteri supragingiva dan subgingiva, mengakibatkan kerusakan jaringan periodontal dan dapat berakibat kehilangan gigi (Ekaputri dan Masulili, 2010).

Pada tahap perkembangan awal, keadaan penyakit periodontal sering menunjukkan gejala yang tidak dirasakan oleh pasien (Ekaputri dan Masulili, 2010). Penyakit periodontal selalu diawali oleh gingivitis, namun tidak semua gingivitis berlanjut menjadi periodontitis. Gejala klinis penyakit periodontal adalah adanya perubahan klinis pada gingiva akibat terjadi inflamasi gingiva, seperti perubahan warna, kontur dan konsistensi gingiva, gingiva mudah berdarah, hilangnya perlekatan gingiva dengan sementum, pembentukan poket dan

perubahan densitas serta ketinggian tulang alveolar. Pada beberapa kasus, resesi margin gingiva juga terjadi (Newman *et al.*, 2006).

Diagnosis penyakit periodontal ditentukan dengan melihat gejala klinis yang terjadi. Cara penentuan diagnosis yang biasanya digunakan adalah melihat perubahan gingiva, kedalaman poket dengan probing, perdarahan saat probing, dan radiografi intraoral untuk melihat resorpsi tulang alveolar (Suwandi, 2010). Selain itu, untuk mengetahui tingkat keparahan penyakit biasanya menggunakan indeks. Indeks yang dapat digunakan adalah Periodontal Indeks Russel (Carranza, 1990).

Penyebab penyakit periodontal multifaktor. Etiologi utama penyakit ini adalah bakteri plak di rongga mulut. Namun, adanya bakteri patogen yang berperan saja tidak cukup menyebabkan terjadinya kelainan. Respon imun dan inflamasi akibat adanya mikroba merupakan hal yang juga penting dalam perkembangan penyakit periodontal yang destruktif, dan juga dipengaruhi oleh pola hidup, lingkungan dan faktor genetik dari penderita (Ekaputri dan Masulili, 2010). Beberapa kelainan sistemik misalnya faktor genetik, nutrisi, hormon dan hematologi dapat berpengaruh buruk terhadap jaringan periodontal. Tetapi faktor sistemik semata tanpa adanya plak bakteri tidak dapat menjadi pencetus terjadinya periodontitis kronis (Hamrun dan Hatta, 2011).

Patogenesis penyakit periodontal merupakan proses yang kompleks. Proses ini melibatkan interaksi bakteri dan respon host. Bakteri dan produknya akan memicu kemotaksis netrofil dan resorpsi tulang alveolar. Ketika ada bakteri maupun produknya, sel epitel akan mengeluarkan interleukin-1 (IL-1), 1β (IL- 1β), *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), prostaglandin E_2 (PGE $_2$) sebagai respon adanya antigen untuk menyediakan sinyal kemotaksis bagi netrofil. Netrofil akan melakukan fungsinya sebagai kontrol bakteri melalui fagositosis, tetapi juga mengeluarkan matriks metalloproteinase (MMP-8) yang berkontribusi dalam kerusakan jaringan. Selain itu, produksi mediator-mediator inflamasi sebagai

respon terhadap bakteri dan toksinnya juga memicu resorpsi tulang melalui aktivasi, proliferasi, dan diferensiasi osteoklas (Newman *et al.*, 2006).

Kerusakan jaringan, terutama jaringan ikat pada jaringan periodontal banyak diperankan oleh enzim proteolitik. Matriks metaloproteinase (MMP) merupakan golongan enzim proteolitik yang dapat dihasilkan oleh netrofil, makrofag, fibroblas, sel epitel, dan osteoklas. MMP adalah proteinase primer dalam proses destruksi jaringan periodontal melalui degradasi molekul ekstraseluler, seperti kolagen, gelatin, dan elastin. MMP-8 dan MMP-1 adalah kolagenase. MMP-8 dilepaskan oleh netrofil yang berinfiltrasi ke jaringan, sedangkan MMP-1 dilepaskan oleh fibroblas, makrofag, dan sel epitel. MMP juga diproduksi oleh patogen periodontal seperti *P. gingivalis* dan *A. Actinomycescomitans*, namun hal ini bukan faktor utama kerusakan jaringan (Newman *et al.*, 2006).

Empat sub grup besar yang secara langsung berhubungan dengan destruksi jaringan ikat periodontal, yaitu kolagenase, gelatinase, stromelisin dan *membrane-type* MMPs (MT-MMPs). Ikatan silang pada kolagen harus dipecah secara proteolitik terlebih dahulu sebelum kolagenase mendapat akses untuk degradasi *triple helix*. Sekali ikatan silang pada kolagen tersebut telah dipecah, kolagenase dapat membuka gulungan *triple helix* untuk mendapat akses ke tiga rantai kolagen. MMP-3 terlibat dalam pembelahan ikatan silang kolagen tipe I yang memiliki kontrol kerusakan kolagen (Thorpe, 2010). Kolagenase (MMP-1, MMP-8, dan MMP-13) bisa mendegradasi kolagen tipe I dengan merusak *triple helix*. Kolagenase memecah serat kolagen menjadi $\frac{1}{4}$ dan $\frac{3}{4}$ fragmen. Selanjutnya, gelatinase (MMP-2 dan MMP-9) dan sistein proteinase melakukan degradasi fragmen kolagen dan pelepasan fibril (De Souza *et al.*, 2005). Untuk efektivitas kolagenolitik, enzim-enzim tersebut harus bisa mengikat kolagen, membuka *triple helix* dan membelah helaian *helix* (Marion, 2006).

2.4. Saliva

Saliva adalah sekret jernih, basa, dan agak kental dari kelenjar parotis, submandibularis, sublingualis, dan kelenjar mukosa kecil mulut lainnya (Dorland, 2010). Saliva merupakan cairan biologis yang kompleks (Miller *et al.*, 2010). Saliva merupakan sekresi yang kompleks. Rata-rata produksi volume saliva setiap hari adalah 500-1000 ml. Kelenjar submandibula memproduksi 70% dari keseluruhan volume, kelenjar parotis 25%, dan kelenjar sublingual sekitar 5% (Pink *et al.*, 2009).

Saliva berasal dari kelenjar saliva mayor dan minor. 93% dari volume saliva berasal dari kelenjar saliva mayor dan sisa 7% berasal dari saliva minor (Puy, 2006). Basis saliva adalah cairan interstisial dari kapiler darah yang masuk melalui duktus salivarius dimana cairan tersebut dimodifikasi dari cairan isotonik menjadi hipotonik. Saliva terdiri dari 98% air. Sisa 2% terdiri dari komponen penting, seperti elektrolit (Na, K, Ca, Mg, hidrogen karbonat, fosfat) dan molekul organik yang terdiri dari mukopolisakarida, glikoprotein, substansi antiseptik (hidrogen peroksida, IgA) serta bermacam-macam enzim (amilase, lisozim, lipase) (Pink *et al.*, 2009). Rata-rata konsentrasi protein dalam saliva adalah 1,5-2 mg/mL (Bigler *et al.*, 2009). Saliva juga mengandung bahan-bahan yang tidak berasal dari kelenjar saliva, yaitu cairan krevikular gingiva, transudat mukosa, ekspektorasi bronkial, sekresi nasal, serum dan darah yang berasal dari luka oral, bakteri, produk bakteri, virus dan fungi, sel epitel yang terdesquamasi, komponen seluler lainnya, dan debris makanan (Mittal *et al.*, 2011; Pfaffe *et al.*, 2011).

Saliva dapat berfungsi dalam membantu melembutkan makanan, membantu sensasi rasa, membantu memperbaiki jaringan lunak yang mengalami kerusakan, menjaga keseimbangan mikroflora, menjaga stabilitas lingkungan rongga mulut, dan membantu remineralisasi enamel. Fungsi paling penting adalah keseluruhan sistem imun proses pertahanan yang dikendalikan oleh protein saliva (Pink *et al.*, 2009).

Saliva adalah cairan rongga mulut yang sederhana, tidak invasif, selalu tersedia, mudah diambil tanpa peralatan yang rumit atau khusus. Pada dua dekade terakhir, saliva telah dievaluasi secara signifikan sebagai bahan diagnostik untuk deteksi kanker di rongga mulut, risiko karies, penyakit kelenjar saliva, periodontitis, dan penyakit sistemik seperti hepatitis C, dan *Human Immunodeficiency Virus* (HIV). Saliva manusia mengandung berbagai macam komponen informatif yang dapat digunakan sebagai suatu penanda (markah) untuk diagnosis penyakit yang diderita seseorang. Penanda ini dapat bermacam-macam, misalnya protein, DNA, dan RNA (Rizal, 2011).

2.5. *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS)

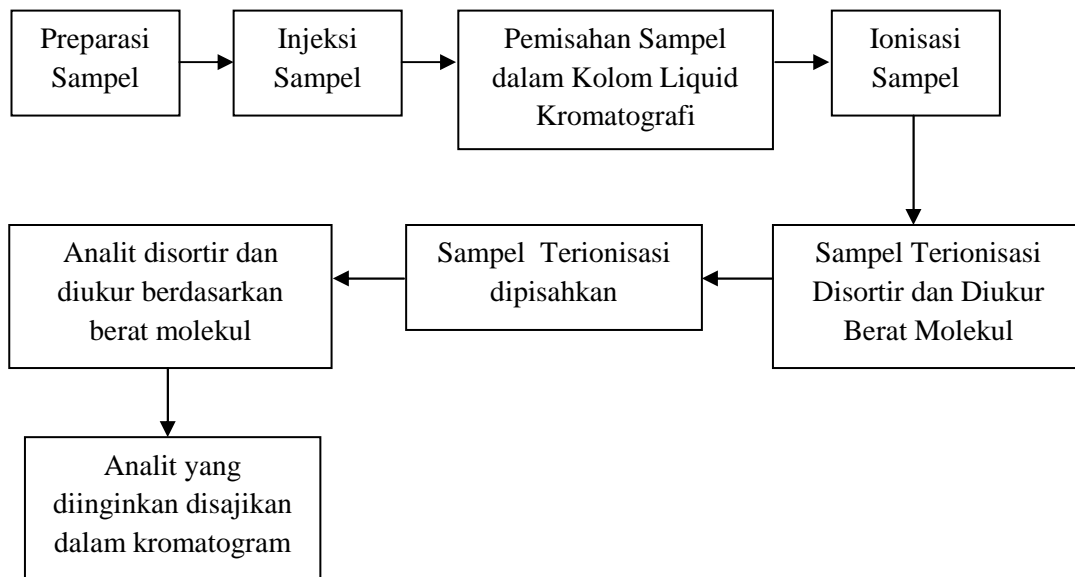
Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) adalah sebuah metode analisis yang mengkombinasikan pemisahan bahan biologis secara efisien dan identifikasi masing-masing komponen menggunakan spektrometri massa. Sampel akan dianalisis oleh kromatografi cair sebelum terionisasi dan dikarakteristikan berdasarkan massa atau berat molekul menggunakan dua spektrometri massa secara serial. Sampel akan dialirkan dari kolom kromatografi cair untuk memisahkan peptida melalui hidrofobisitas, kemudian terionisasi dan ditransfer dengan efisiensi tinggi ke dalam spektrometri massa (Mann *et al.*, 2001). Dengan kata lain, sampel dipisahkan oleh kromatografi cair dan spektrometri massa untuk selanjutnya dideteksi berdasarkan berat molekul. Teknik ini memiliki waktu kerja lebih pendek dan memiliki selektivitas dan sensitivitas yang tinggi (Srivastava *et al.*, 2013).

Kromatografi cair adalah teknik pemisahan untuk analisis dan pemurnian senyawa dalam suatu sampel. Kromatografi ini memisahkan molekul berdasarkan perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan fase diam. Molekul yang terlarut dalam fase gerak akan melewati kolom sebagai fase diamnya. Fase gerak membawa cuplikan dan fase diam menahan cuplikan secara selektif. Fase gerak

akan bergerak melalui fase diam. Fase diam adalah fase yang secara tetap tidak bergerak (Sudjadi, 2012).

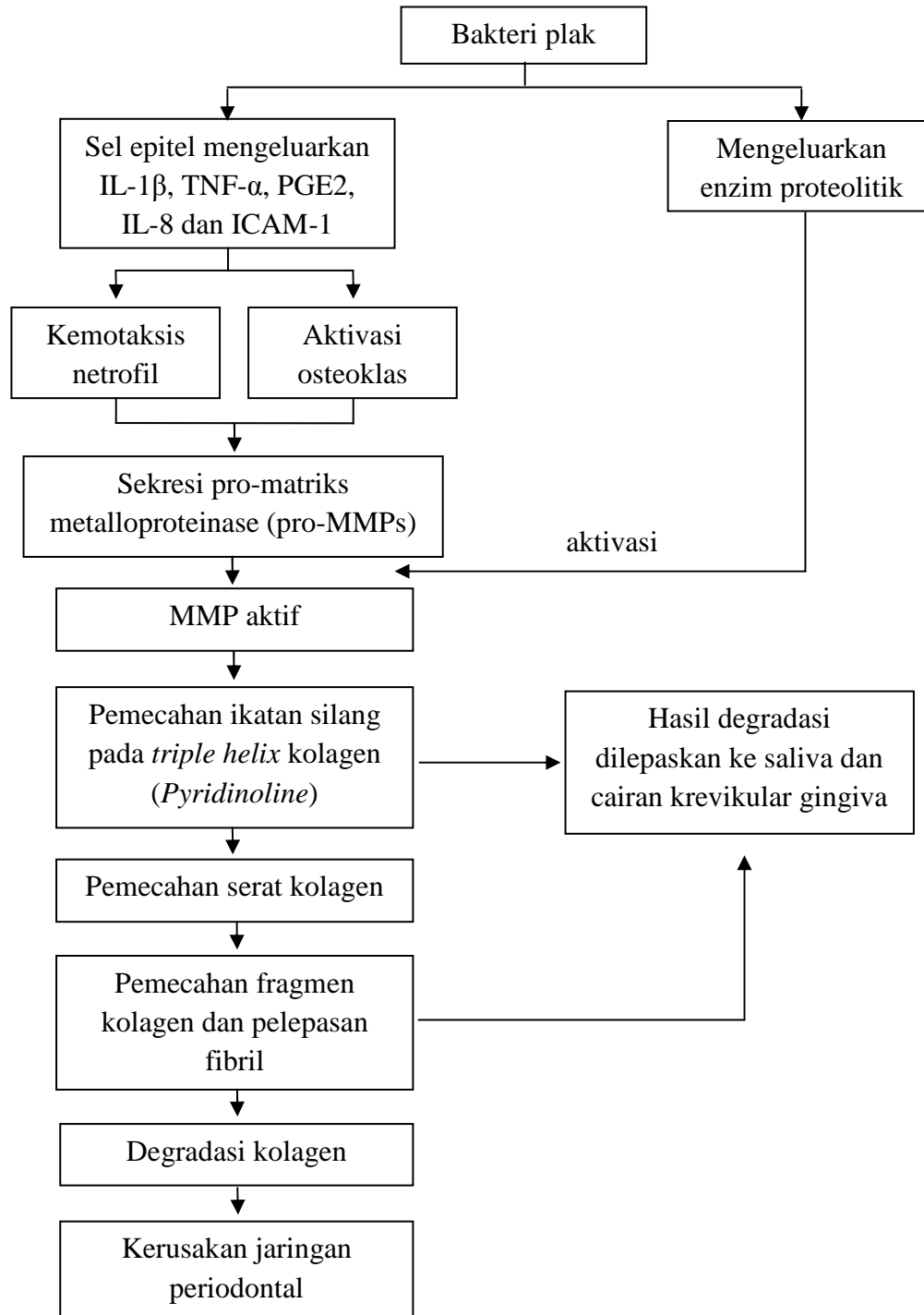
Selama ini detektor yang banyak digunakan untuk teknik tersebut adalah ultraviolet-visible, *diode array*, dan fluoresensi. Teknik tersebut mendeteksi senyawa atau metabolit berdasarkan absorpsi atau emisi cahaya, spektroskopi resonansi magnetik. Meski mampu mendeteksi, teknik ini memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang rendah (Lu *et al.*, 2005). Saat ini, analisis senyawa mulai mengarah pada detektor spektrometri massa. Spektrometri massa adalah instrumen yang dapat menyeleksi molekul-molekul gas bermuatan berdasarkan massa atau beratnya. Metode ini akan mengubah komponen sampel menjadi ion-ion gas dan memisahkannya berdasarkan perbandingan massa terhadap muatan (Khopkar, 2010). Spektrometri massa bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa, sesuai rasio fragmentasi. Dua komponen kunci dalam proses ini adalah sumber ion yang akan menghasilkan ion dan analisis massa yang menyeleksi dan mendeteksi ion (Ginting, 2012).

LC-MS/MS menggunakan tandem spektrometri massa dengan analisis massa yang banyak digunakan adalah *triple quadrupole*. *Quadrupole* pertama digunakan untuk memilih prekursor ion. *Collision induced dissociation*/CID mengambil tempat di tahap kedua dimana terjadi proses tabrakan. Ion analit terfragmentasi karena molekul bertabrakan dengan netral yang dikenal sebagai disosiasi tabrakan induksi CID. Tegangan diberikan kepada ion-ion analit untuk menambahkan energi agar mampu melakukan tabrakan sehingga menciptakan fragmentasi lagi. Pada tahap ketiga akan menghasilkan spektrum produk ion. Pada proses ini terjadi seleksi ion, dimana hanya ion produk yang memenuhi kuantitas dan kualitas senyawa target yang akan tampil dalam spektrum (Ginting, 2012).



Gambar 2.5. Prinsip Kerja LC-MS/MS (Sumber: Wright dan Steiner, 2004)

2.6. Kerangka Konsep



Gambar 2.6. Kerangka Konsep

2.7. Hipotesis

Berdasarkan uraian di atas, diduga terdapat perbedaan kadar *pyridinoline* saliva pada berbagai tingkat keparahan penyakit periodontal inflamatorik.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Pada penelitian ini, peneliti melakukan pengamatan terhadap kadar *pyridinoline* pada saliva penderita penyakit periodontal inflamatorik. Observasi ini dilakukan satu kali saja dan diukur dalam waktu yang sama.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2013 hingga Januari 2014. Penelitian ini dilakukan di RSGM Universitas Jember dan Laboratorium Kimia Analisis Instrumentasi Fakultas Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang.

3.3. Subyek Penelitian

Subyek penelitian dipilih secara *purposive sampling*. Subyek penelitian dipilih berdasarkan tujuan penelitian, yaitu pasien penyakit periodontal inflamatorik yang memenuhi kriteria. Tingkat keparahan inflamasi periodontal diukur berdasarkan Periodontal Indeks (PI) modifikasi Russel. Pemilihan subyek penelitian dilakukan selama dua bulan.

Kriteria subyek penelitian adalah sebagai berikut.

1. Kriteria inklusi:
 - a. Subyek penelitian adalah wanita dengan usia 30-50 tahun.
 - b. Gigi yang tersisa minimal 20 gigi.
 - c. Subyek didiagnosa oleh dokter gigi berdasarkan PI.
2. Kriteria eksklusi:
 - a. Subyek memiliki kelainan atau penyakit sistemik.

- b. Subyek mempunyai kebiasaan merokok.
- c. Subyek menggunakan obat kumur, antibiotik, atau obat-obatan minimal 6 bulan terakhir.
- d. Subyek sedang dalam perawatan periodontal 6 bulan terakhir.
- e. Subyek sedang hamil, menyusui, atau menstruasi.
- f. Subyek menggunakan gigi tiruan.
- g. Subyek mengalami mukositis.
- h. Subyek memiliki karies media, karies profunda, atau profunda perforasi.

Subyek penelitian yang didapatkan sebanyak 15 orang. Subyek penelitian berdasarkan kriteria klinis PI dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu lima orang dengan *simple* gingivitis (G), lima orang dengan awal penyakit periodontal destruktif (AP), dan lima orang dengan penyakit periodontal destruktif (DP).

3.4. Identifikasi Variabel

3.4.1. Variabel Bebas: Penyakit periodontal inflamatorik

a. Definisi Operasional

Penyakit periodontal inflamatorik adalah penyakit inflamasi pada jaringan penyangga gigi yang ditandai dengan perubahan klinis pada gingiva seperti kemerahan, konsistensi lunak, permukaan gingiva halus dan interdental membulat, perdarahan saat probing, adanya poket periodontal, dan resorpsi tulang alveolar.

b. Teknik dan Alat Perolehan Data

Data penyakit periodontal diketahui dari pemeriksaan klinis dan radiografis. Parameter yang digunakan untuk menilai tingkat keparahan inflamasi periodontal adalah skor PI.

3.4.2. Variabel Tergantung: Kadar *pyridinoline* saliva

a. Definisi Operasional

Kadar *pyridinoline* adalah konsentrasi *pyridinoline* yang terdapat pada saliva penderita penyakit periodontal inflamatorik dengan satuan ppm.

b. Teknik dan Alat Perolehan Data

Kadar *pyridinoline* dianalisa menggunakan *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS). Pengukuran kadar *pyridinoline* dalam satuan ppm dilakukan menggunakan *software* LC Quan.

3.5. Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1. Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *dental chair*, rontgen, *handscoon*, masker, kaca mulut, sonde, pinset, *neerbecken*, probe periodontal WHO, pot saliva, *eppendorf*, mikropipet, *ice box*, *deep freezer*, filter nilon 0,2 μ m, kolom Hypersil Gols 2 μ m panjang 10 cm (Thermo Scientific), dan LC-MS/MS terdiri dari *Ultra High Performance Liquid Chromatography/UHPLC* (Accelerate Thermo Scientific) dan *Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) triple quadropole* (Thermo Scientific).

3.5.2. Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah film foto periapikal, saliva, fase gerak asetonitril gradient grade (E merck), aquabides, standar *pyridinoline* kalibrator (Quidel, San Diego CA 92121 USA), asam formiat (E merck).

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. *Ethical Clearance*

Ethical clearance diperoleh dari komisi etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada. Subyek penelitian harus mengisi dan menyetujui *informed consent*.

3.6.2. Pemeriksaan Rongga Mulut

Subyek penelitian dilakukan pemeriksaan intra oral, yaitu menghitung jumlah gigi yang tersisa pada rongga mulut dan memeriksa gigi-gigi yang mengalami karies (Tabel 3.3.). Selanjutnya, dilakukan pemeriksaan jaringan periodontal menggunakan PI (Tabel. 3.1.). Tingkat keparahan penyakit periodontal ditentukan berdasarkan kriteria klinis PI (Tabel 3.2.)

Tabel 3.1. Kriteria dan skor PI modifikasi Russel (Carranza, 1990)

Skor	Kriteria dan Skor PI	Hasil Radiografi
0	Negatif. Tidak ada inflamasi atau gangguan fungsi yang disebabkan oleh kerusakan jaringan periodontal.	
1	Gingivitis ringan. Terdapat inflamasi pada margin gingiva, tetapi tidak mengelilingi gigi.	Tulang alveolar normal
2	Gingivitis. Inflamasi pada gingiva yang mengelilingi gigi, tetapi tidak terjadi kerusakan perlekatan epitel.	
4		Resorpsi pada puncak alveolar
6	Gingivitis dengan pembentukan poket. Terjadi kerusakan perlekatan epitel, terdapat poket, tetapi tidak terjadi gangguan fungsi pengunyahan dan gigi tidak miring	Resorpsi tulang secara horizontal meliputi puncak alveolar hingga setengah panjang akar gigi
8	Kerusakan lanjut disertai gangguan fungsi mastikasi	Resorpsi tulang meliputi lebih dari setengah panjang akar atau adanya poket infraboni dengan perluasan ligamen periodontal, resorpsi akar maupun apeks

Skor periodontal indeks tiap individu adalah sebagai berikut.

$$PI = \frac{\text{Jumlah skor indeks periodontal per gigi}}{\text{Jumlah gigi yang diperiksa}}$$

Tabel 3.2. Kriteria klinis PI modifikasi Russel (Carranza, 1990)

Kondisi Klinis	Skor PI	Kriteria Penyakit
Normal	0 – 0,2	Normal
<i>Simple</i> gingivitis	0,3 – 0,9	<i>Reversible</i>
Awal penyakit periodontal destruktif	0,7 – 1,9	
Penyakit periodontal destruktif	1,6 – 5,0	<i>Irreversible</i>
Akhir penyakit periodontal	3,8 – 8,0	

Tabel 3.3. Klasifikasi Karies

Kriteria	Keterangan
Normal	Negatif. Tidak karies
Karies superfisial	Karies mengenai enamel
Karies media	Karies mengenai enamel dan belum melebihi setengah dentin
Karies profunda	Karies mengenai lebih dari setengah dentin sampai ke pulpa Stadium I : Belum terjadi inflamasi pulpa Stadium II : Sudah ada inflamasi pulpa Stadium III : Sudah perforasi dan terjadi inflamasi

3.6.3. Pengambilan Sampel Saliva

Subyek penelitian diinstruksikan tidak makan dan minum minimal 60 menit sebelum pengumpulan saliva. Sebelum saliva diambil, subyek penelitian diinstruksikan menyikat gigi terlebih dahulu. Saliva diambil sekitar pukul 08.00 sampai pukul 14.00. Saliva diambil tanpa stimulus. Subyek diinstruksikan menutup mulut untuk menunggu saliva terkumpul. Selanjutnya, pasien diminta untuk mengeluarkan saliva ke dalam pot saliva. Hal ini dilakukan hingga mencapai saliva sebanyak 2 ml. Pot saliva dimasukkan dalam *ice box* dengan suhu 2-4°C dan diukur kadar *pyridinoline* menggunakan LC-MS/MS. Jika kadar *pyridinoline* saliva tidak langsung diukur dalam waktu 24 jam, maka saliva disimpan dalam *deep freezer* dengan suhu -30°C sampai akan dilakukan pengukuran kadar *pyridinoline*.

3.6.4. Pengukuran Kadar *Pyridinoline*

a. Pengaturan LC-MS/MS

LC-MS/MS terdiri dari UHPLC dan MS/MS. Suhu pada autoinjeksi diatur pada suhu 10°C. UHPLC diatur pada kondisi isokratik, yaitu komposisi dan aliran fase gerak konstan. Fase gerak A terdiri dari campuran 30% asetonitril dan 0,1% asam formiat. Fase gerak B terdiri dari campuran 70% H₂O dan 0,1% asam formiat. Kecepatan fase gerak diatur sebesar 300 µl/menit. Kolom dijaga pada suhu 40°C. MS/MS diatur pada *scan type selected ion monitoring* dengan (SIM), *scan time* 0,050 detik, *scan width* 0,010 m/z. Pengaturan Q1MS dengan *center mass pyridinoline* 429.2 m/z. Ionisasi dengan menggunakan *high electrospray ionisation* (HESI) dengan kondisi *spray voltage* 3200 V, *vaporizer temperature* 250°C, *sheath gas pressure* 45 bar, *aux gas pressure* 15 bar, dan *capillary temperature* pada 300°C.

b. Pembuatan larutan standar

Larutan standar *pyridinoline* kalibrator memiliki konsentrasi 6,20 ppm. Larutan standar A diambil sebanyak 50 µl, dilakukan pengenceran menjadi 1 ml setara dengan 311 ng/ml *pyridinoline*. Larutan standar B diambil sebanyak 75 µl, dilakukan pengenceran menjadi 1 ml setara dengan 467 ng/ml. Injeksi standar dilakukan secara serial. Volume injeksi mulai dari 1 µl sampai dengan 12 µl.

c. Preparasi Sampel

Larutan sampel diambil sebanyak 50 µl, dilakukan pengenceran menjadi 1 ml. Larutan tersebut disaring dengan menggunakan filter nylon 0,2 µM, kemudian dianalisis dengan LC-MS/MS dengan volume injeksi 0,1 µl sampai dengan 10 µl.

d. Analisis Kadar *Pyridinoline*

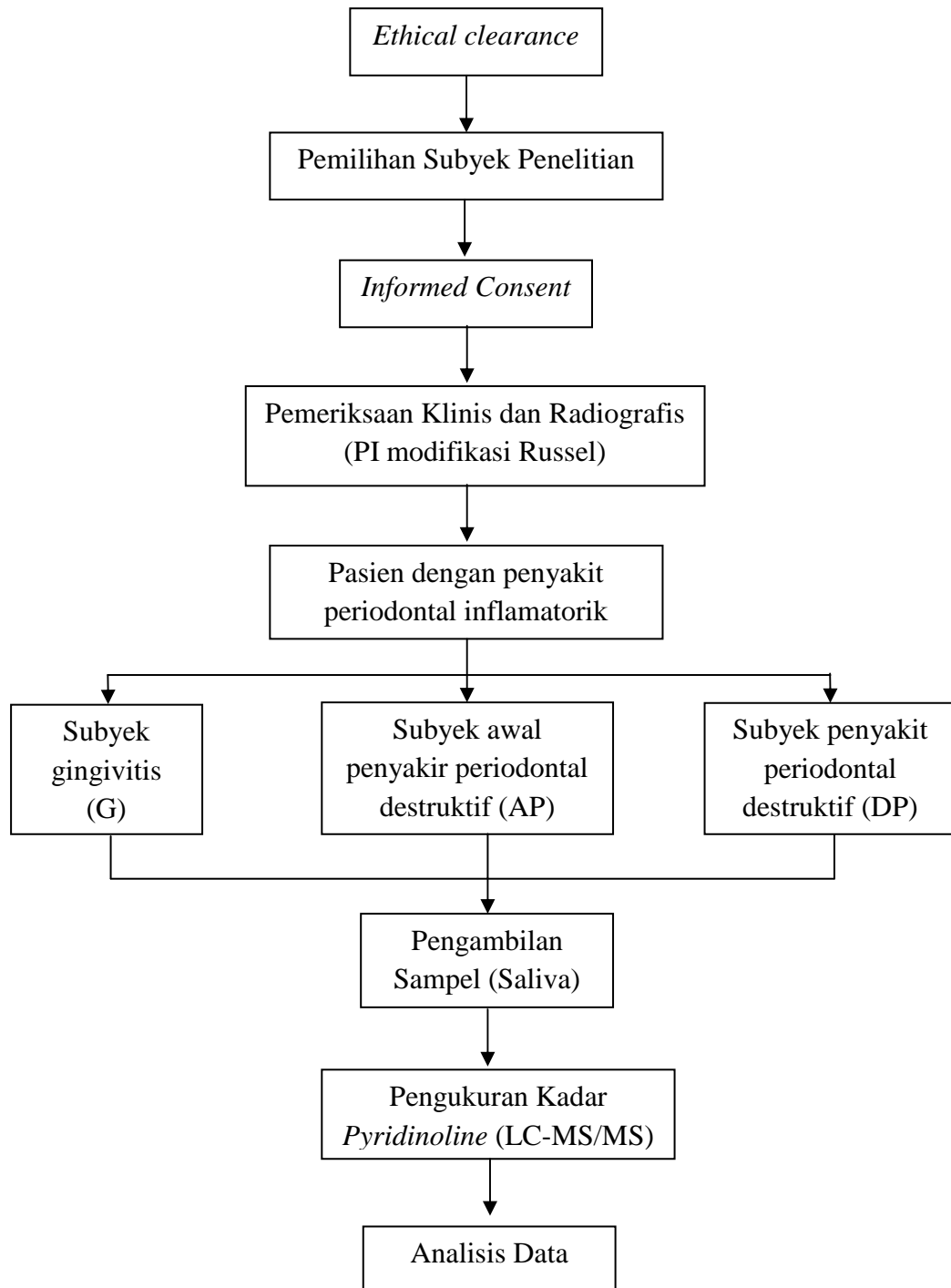
Kadar *pyridinoline* saliva diukur melalui menggunakan LC-MS/MS dengan prosedur sebagai berikut :

1. Sampel yang telah dipreparasi ditempatkan pada auto injeksi.
2. Larutan fase gerak disiapkan dan disimpan dalam reservoir, kemudian fase gerak akan digerakkan oleh pompa masuk kedalam pipa-pipa yang akan melewati tempat penyuntikan sampel.
3. Sampel akan masuk kedalam aliran fase gerak selanjutnya menuju kolom.
4. Di dalam kolom LC-MS/MS senyawa akan dipisahkan.
5. Senyawa yang dipisahkan kemudian di tembak ion hingga senyawa menjadi pecah atau terfragmentasi.
6. Senyawa bermuatan akan dibelokkan oleh magnet dan terpisahkan sesuai dengan berat molekul masing masing.
7. Senyawa yang telah tersortir masuk ke ruang analisis dan kadar akan terlihat pada komputer dengan bentuk kurva.
8. Dengan menggunakan *software* LC Quan, kurva dapat diubah menjadi satuan ppm.

3.7. Analisis Data

Hasil penelitian yang didapatkan dianalisis menggunakan uji *Kolmogorof Smirnov* untuk mengetahui normalitas data dan uji *Levene* untuk mengetahui homogenitas data. Selanjutnya, data dilakukan uji statistik *One-way Anova* untuk mengetahui perbedaan kadar *pyridinoline* saliva pada berbagai tingkat keparahan inflamasi periodontal dengan tingkat signifikansi 5 % ($p < 0,05$).

3.8. Alur Penelitian



Gambar 3.1. Alur Penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

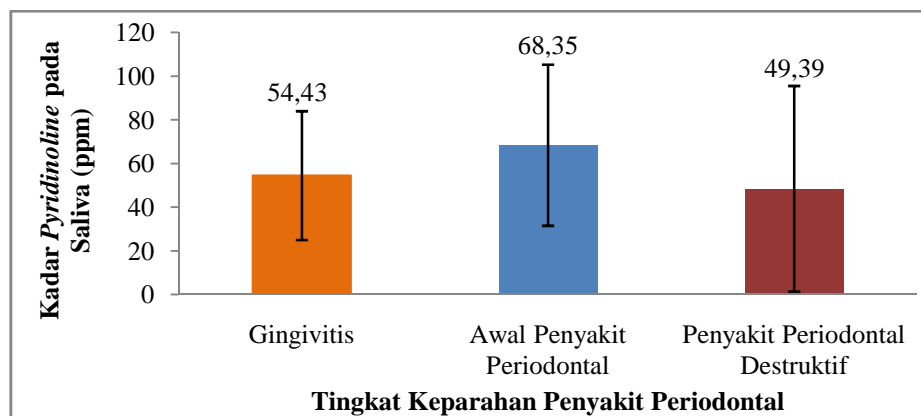
4.1. Hasil Penelitian

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan deskripsi subyek penelitian seperti tercantum pada Tabel 4.1 dan Gambar 4.1. Kadar *pyridinoline* saliva tertinggi terdapat pada subyek penderita awal penyakit periodontal dengan rata-rata 68,35 ppm. Kadar *pyridinoline* saliva lebih rendah pada kelompok gingivitis dengan nilai 54,43 ppm. Kadar *pyridinoline* saliva terendah terdapat pada subyek penderita penyakit periodontal destruktif dengan nilai 49,39 ppm.

Tabel 4.1. Rata-rata Kadar *Pyridinoline* pada Saliva Penderita Penyakit Periodontal Inflamatorik

Variabel	N	Kadar <i>Pyridinoline</i> (ppm) $\bar{x} \pm SD$	<i>p</i>
Gingivitis	5	54,43 ± 28,48	0,729
Awal Penyakit Periodontal	5	68,35 ± 36,91	
Penyakit Periodontal Destruktif	5	49,39 ± 47,10	

n = jumlah subyek penelitian
 $\bar{x} \pm SD$ = rata-rata ± simpang baku
 p = signifikansi



Gambar 4.1. Rata-rata Kadar *Pyridinoline* pada Saliva Penderita Penyakit Periodontal Inflamatorik

Uji normalitas *Kolmogorof-Smirnov* menunjukkan data terdistribusi normal ($p>0,05$) (Lampiran F.1). Uji homogenitas *Levene Test* menunjukkan data yang diperoleh homogen ($p>0,05$) (Lampiran F.2). Hasil uji *One-way Anova* menunjukkan nilai signifikansi $p>0,05$ (Lampiran F.3). Hal ini menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan kadar *pyridinoline* saliva pada berbagai tingkat keparahan inflamasi periodontal.

4.2. Pembahasan

Penyakit periodontal inflamatorik adalah penyakit inflamasi pada jaringan penyangga gigi yang banyak diderita masyarakat. Menurut Pusat Data Departemen Kesehatan Republik Indonesia, penyakit periodontal berada di peringkat ke-8 di antara 10 penyakit utama pasien rawat jalan di rumah sakit umum (Santoso dan Waspadji, 2008). Penyakit ini dapat menyebabkan tanggalnya gigi seseorang (Suwandi, 2010).

Diagnosa penyakit periodontal biasanya dilakukan berdasarkan pemeriksaan klinis dan radiografis (Leonhardt *et al.*, 2011). Penyakit periodontal biasanya ditandai dengan adanya perubahan klinis pada gingiva yang menunjukkan adanya tanda-tanda inflamasi. Selain itu penderita penyakit periodontal mengalami hilangnya perlekatan gingiva dan kerusakan tulang alveolar lebih dalam, pembentukan poket periodontal, migrasi patologis yang menimbulkan diastema, dan kegoyangan gigi yang dapat berakibat tanggalnya gigi (Suwandi, 2010). Penyakit periodontal inflamatorik biasanya diawali oleh gingivitis. Gingivitis dapat berlanjut menjadi periodontitis apabila tidak segera dirawat (Wahyukundari, 2009).

Penyakit periodontal merupakan penyakit multifaktorial. Penyakit ini dapat disebabkan karena ketidakseimbangan antara bakteri plak dan respon inang (Hamrun dan Hatta, 2011). Bakteri plak pada rongga mulut menyebabkan inflamasi pada jaringan periodontal. Ketika bakteri plak terakumulasi pada rongga mulut, terjadi pelepasan sejumlah mediator inflamasi seperti prostaglandin E_2

(PGE₂), interleukin (IL)-1 β , IL-6, atau *tumor necrosis factor* (TNF)- α . Pelepasan mediator inflamasi tersebut menyebabkan terjadinya kemotaksis neutrofil. Selanjutnya, neutrofil akan melakukan fagositosis bakteri dan mengeluarkan sejumlah enzim, seperti matriks metaloproteinase (MMPs). Pelepasan mediator inflamasi akan menstimulasi osteoklas untuk meresorpsi tulang alveolar, menghambat produksi kolagen, dan menyebabkan degradasi kolagen. Mekanisme tersebut akan menyebabkan kerusakan jaringan ikat periodontal (Newman *et al.*, 2006; Serio dan Duncan, 2009).

Kerusakan jaringan ikat periodontal dimulai dengan terdegradasinya matriks organik, yaitu kolagen tipe I sebagai penyusun utama jaringan periodontal (Wahyukundari, 2009). Kolagen tipe I terdiri dari serat kolagen yang membentuk ikatan *triple helix*. Kolagen tipe I ini diikat oleh ikatan piridinium (Taba *et al.*, 2005). Salah satu ikatan piridinium adalah *pyridinoline*. Sejumlah penelitian menyebutkan bahwa ikatan piridinium pada kolagen harus terbelah terlebih dahulu sebelum kolagenase mendegradasi *triple helix* kolagen. Jika ikatan piridinium tersebut terbelah, kolagenase akan membuka gulungan *triple helix* dan selanjutnya akan mendegradasi ketiga serabut kolagen (Etherington, 1977; Thorpe, 2010).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan rata-rata kadar *pyridinoline* tertinggi terdapat pada kelompok awal penyakit periodontal, kemudian lebih rendah pada kelompok gingivitis dan terendah pada kelompok penyakit periodontal destruktif. Hasil ini diduga karena pada tahap penyakit periodontal destruktif, kerusakan kolagen sudah mulai melambat atau berhenti. Aktivitas MMPs dalam mendegradasi matriks ekstraseluler dimungkinkan telah dihambat oleh *tissue inhibitor matrix protease* (TIMPs) pada tahap penyakit periodontal destruktif sehingga kadar *pyridinoline* lebih rendah (Liao *et al.*, 2011). Rata-rata kadar *pyridinoline* tertinggi terdapat pada awal penyakit periodontal. Hal ini kemungkinan disebabkan karena belum ada keseimbangan antara MMPs dan TIMPs. Ketidakseimbangan aktivitas MMPs dan TIMPs dapat menyebabkan

kerusakan kolagen yang lebih dominan pada tahap ini (Deo dan Bhongade, 2010). Selain itu, kadar *pyridinoline* pada kelompok gingivitis lebih rendah daripada awal penyakit periodontal diduga karena kolagen terbanyak pada gingiva adalah kolagen tipe III (Wilson dan Kornman, 1996), sedangkan *pyridinoline* merupakan ikatan silang spesifik untuk kolagen tipe I (Tanimoto *et al.*, 2003). Hal ini memungkinkan kadar *pyridinoline* akan lebih rendah pada gingivitis meski MMPs pada tahap tersebut masih aktif.

Proses penyembuhan selalu mengiringi proses inflamasi. Saat sel dan jaringan sedang mengalami infeksi, terjadi peristiwa perusakan sekaligus penyembuhan (Kumar *et al.*, 2007). Ketika terjadi inflamasi, MMPs akan bekerja mendegradasi matriks ekstraseluler, termasuk kolagen. Aktivitas MMPs ini dikontrol dan dihambat oleh TIMPs sehingga proses perusakan dan perbaikan dapat berjalan seimbang (Visse dan Nagase, 2003). Jika aktivitas MMPs terhambat, maka proses degradasi kolagen akan menurun atau terhenti sehingga *pyridinoline* yang terderadasi pun ikut menurun atau terhenti. Hal ini akan menyebabkan kadar *pyridinoline* pada saliva lebih rendah. Sedangkan pada aktivitas MMPs dan TIMPs yang tidak seimbang, degradasi kolagen akan menjadi dominan. Hal ini akan menyebabkan kadar *pyridinoline* juga banyak terdegradasi dan disekresikan ke saliva sehingga kadarnya menjadi meningkat.

Berdasarkan hasil analisis data, didapatkan tidak ada perbedaan yang signifikan kadar *pyridinoline* pada berbagai tingkat keparahan inflamasi periodontal. Hasil ini diduga karena jumlah subyek penelitian yang sedikit. Jumlah subyek penelitian merupakan hal yang penting dalam rancangan penelitian. Jumlah subyek penelitian yang sedikit ini cenderung memiliki kesalahan sampling yang besar dan kurang representatif (Mortin *et al.*, 2008).

Beberapa faktor dapat mempengaruhi kadar *pyridinoline* saliva. Hal ini juga diduga dapat menjadi salah satu penyebab hasil yang tidak signifikan. Saliva sebagai bahan biologis untuk evaluasi kadar *pyridinoline* penderita penyakit periodontal inflamatorik dipengaruhi oleh banyak faktor. Saliva tidak hanya

mengandung cairan berasal dari serum, tetapi juga mikroflora rongga mulut serta produk-produk inflamasi. Saliva menggambarkan keadaan-keadaan lokal rongga mulut, kelenjar saliva dan jaringan sekitarnya, serta sistemik (Al-Tarawneh *et al.*, 2011). Hal ini memungkinkan saliva tidak hanya dipengaruhi oleh faktor endogen, tetapi juga faktor eksogen.

Umur adalah salah satu faktor endogen yang diduga dapat berpengaruh terhadap kadar *pyridinoline* saliva. Penelitian Moriguchi dan Fujimoto (1978) menyatakan bahwa kadar *pyridinoline* mulai menurun pada umur 30 tahun. Vesper (2005) menyatakan bahwa selama masa anak-anak dan remaja, kadar *pyridinoline* berhubungan dengan pertumbuhan, dengan kadar tertinggi pada awal kelahiran. Kadar *pyridinoline* menurun dengan cepat dan akan konstan selama masa anak-anak, meningkat lagi selama pubertas, dan kemudian menurun serta sangat rendah selama masa dewasa.

Faktor eksogen yang diduga dapat mempengaruhi kadar *pyridinoline* saliva adalah inflamasi di rongga mulut, beberapa diantaranya adalah karies dan mukositis. Karies diduga dapat mempengaruhi kadar *pyridinoline* karena *pyridinoline* juga ditemukan pada enamel dalam jumlah sedikit dan terdapat pada dentin (Acil *et al.*, 2005). *Pyridinoline* juga terdapat pada jaringan lunak, salah satunya adalah mukosa rongga mulut (Khurana, 2009). Ketika terjadi karies atau mukositis, *pyridinoline* akan terdegradasi dan dilepaskan ke dalam saliva.

Berdasarkan analisis di atas, dapat diketahui bahwa kadar *pyridinoline* saliva dipengaruhi oleh beberapa faktor sehingga perlu dikaji kembali pemanfaatan kadar *pyridinoline* saliva sebagai evaluasi penyakit periodontal inflamatorik. Meski saliva memiliki banyak kelebihan, namun kadar *pyridinoline* saliva belum dapat digunakan untuk menggambarkan inflamasi periodontal.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah tidak ada perbedaan kadar *pyridinoline* pada berbagai tingkat keparahan inflamasi periodontal. Kadar *pyridinoline* saliva tidak dapat menunjukkan tingkat keparahan kerusakan jaringan pada penyakit periodontal inflamatorik.

5.2. Saran

Saran penulis dalam skripsi ini adalah sebagai berikut.

1. Jumlah subjek penelitian merupakan hal yang penting pada rancangan penelitian. Jumlah subyek penelitian yang sedikit cenderung memiliki kesalahan sampling yang menjadi besar dan kurang representatif. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian kadar *pyridinoline* pada saliva penderita penyakit periodontal menggunakan jumlah subyek penelitian yang lebih banyak.
2. Saliva merupakan salah satu bahan biologis yang banyak dipengaruhi oleh faktor endogen dan eksogen. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian kadar *pyridinoline* pada cairan biologis lain atau membandingkan kadar *pyridinoline* saliva dengan kadar *pyridinoline* pada cairan biologis lain, misalnya serum untuk evaluasi penyakit periodontal.

DAFTAR PUSTAKA

- Acil, Mobasser, Warnke, Terheyden, Wiltfang, & Springer. 2005. Detection of Mature Collagen in Human Dental Enamel. *Calcif Tissue Int.* 76(2): 121-126.
- Al-Tarawneh, Border, Dibble, & Bencharit. 2011. Defining Salivary Biomarkers Using Mass Spectrometry-Based Proteomics: A Systematic Review. *J Int Biol.* 15(6): 1-10.
- Arican, Koylu, Uyaroglu, Erol, & Çalim. 2004. Diagnostic Importance of Deoxypyridinoline and Osteocalcin in Equine Osteoarthritis. *Acta Vet Brno.* 73: 491-496.
- Armitage, G.C. 2004. Analysis of Gingival Crevice Fluid and Risk of Progression of Periodontitis. *Periodontol 2000.* 34: 109-119.
- Bigler, L.R., Streckfus, C.F., & Dubinsky, W.P. 2009. Salivary Biomarkers for the Detection of Malignant Tumors That are Remote from the Oral Cavity. *Clin Lab Med.* 29: 71-85.
- Berkovits, B.K.B., Moxham, B.J., & Newman, H.N. 1995. *The Periodontal Ligament in Health and Disease.* Tavistock Square: Mosby-Wolfe.
- Bullon, Chandler, Egea, Cano, & Sahuquillo. 2007. Osteocalcin in Serum, Saliva and Gingival Crevicular Fluid: Their Relation with Periodontal Treatment Outcome in Postmenopausal Women. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 12:E193-E197.
- Bush, D.R. 2013. *The LC/MS/MS Analysis of Pyridinoline and Desmosines in Hypertensive Mouse Aorta, Elucidation of Argininen and Proline Fragmentation for The Analysis of Arginine Metabolism in Mosquitoes by LC/MS/MS, and Mudpit Identification of B. Pseumallei Proteins in Urine.* Dissertation. University of Arizona.
- Carranza, F.A. 1990. *Clinical Periodontology.* Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Carrin, S.V., Garnero, P., & Delmas, P.D. 2006. The Role of Collagen in Bone Strength. *Osteoporosis Int.* 17: 319-336.

- Deo & Bhongade. 2010. *Pathogenesis of Periodontitis - Role of Cytokines in Host Response*. http://www.dentalcetoday.com/courses84pdfdt-sept_10_129.pdf. Diakses tanggal 7 Desember 2013.
- De Souza, Da Silva, Catanzo-Guimares, & Line. 2005. Matrix Metalloproteinases: The Most Important Pathway Involved with Periodontal Structure. *Braz J Oral Sci.* 4(15): 884-890.
- Dorland, W.A.N. *Kamus Kedokteran Dorland Edisi 31*. Alih Bahasa oleh Retna Nearly Elseria. 2010. Jakarta: EGC.
- Ekaputri, S. & Masulili S.L.C. 2010. Cairan Sulkus Gingiva sebagai Indikator Keadaan Jaringan Periodontal. *Maj Ked Gi.* 17(1): 74-78.
- Etherington, D.J. 1977. Collagen Degradation. *Ann. rheum. Dis.* 36: 14-17.
- Gelse, K., Poschl, E., & Aigner, T. 2003. Collagen-Structure, Function, and Biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Review.* 55: 1531-1546.
- Ginting, M.K. 2012. *Validasi Metode LC-MS/MS untuk Penentuan Senyawa Asam Trans, Trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3-Metil Hippurat, Asam 4-Metil Hippurat dalam Urin sebagai Biomarker Paparan Benzena, Toluena, dan Xilena*. Skripsi. Depok: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- Hamrun, N. dan Hatta, M. 2011. Polimorfisme Gen Vitamin D Receptor Pada Penderita Periodontitis Kronis. *JST Kesehatan.* 1(2): 165 – 172.
- Husain. 1999. Urinary Excretion of Pyridinium Crosslinks in Healthy 4-10 Years Old. *Arch Dis Child.* 80: 370-373.
- Istok, Czirjak, Lukac, Stancikova, & Rovensky. 2001. Increased Urinary Pyridinoline Cross-link Compound of Collagen in Patients with Systemic Sclerosis and Raynaud's Phenomenon. *Rheumatol.* 40: 140-146.
- Junqueira, L.C. dan Carlos, L. *Histologi Dasar: Teks dan Atlas*. Edisi 10. Alih Bahasa oleh Jan Tambayong. 2007. Jakarta: EGC.
- Kashu, Baiju, Bansal, & Chhillar. 2012. Salivary Biomarker: A Periodontal Overview. *JOHCD.* 6(1): 28-33.

- Kindt, Rossi, Boucheva, & Hallak. 2000. Quantitative Method for Biomarkers of Collagen Degradation Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal Biochem.* 283: 71-76.
- Khatariya, R. & Pradeep, A.R. 2010. Salivary Proteomic Biomarkers for Oral Diseases: A Review of Literature. *AOSR.* 1(1): 43-49.
- Khurana, J.S. 2009. *Bone Pathology 2nd Edition.* Philadelphia: Humana Press.
- Khopkar, S.M. Konsep Dasar Kimia Analitik. Alih Bahasa oleh Saptorahardjo. 2010. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia UI-PRESS.
- Kraenzelin, Claude, Christian, Cecilia, & Beat. 2008. Automated HPLC Assay for Urinary Collagen Cross-link: Effect of Age Menopause, and Metabolic Bone Disease. *Clinical Chemistry.* 54(9): 1546-1553.
- Kumar, V., Cotran, R.S., dan Robbins, S.L. Buku *Ajar Patologi Volume 1 Edisi 7.* Alih Bahasa oleh Prasetyo, Pendit, Priliono. 2007. Jakarta: EGC.
- Leonhardt, Carlen, Bengtsson, & Dahlen. 2011. Detection of Periodontal Markers in Chronic Periodontitis. *Open Dent J.* 5: 110-115.
- Liao, Loo, Li, Liang, Wang, Cheung, & Luo. 2011. The Effect of Chronic Periodontitis on Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2), Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1), Interleukin-12 (IL-12) and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF). *African J Biotech.* 10(16): 3070-3076.
- Lu, W., Kimball, E., & Rabinowitz, D. 2005. A High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Quantitation of Nitrogen-Containing Intracellular Metabolites. *J Am Soc Mass Spectrom.* 17: 37-50.
- Mann, M., Hendrickson, R.C., & Pandey, A. 2001. Analysis of Protein and Proteomes by Mass Spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 437-473.
- Marion, M.M.H. 2006. *Matrix Metalloproteinases and Collagen Remodelling.* <http://www.mate.tue.nl>. Diakses tanggal 22 Mei 2013.
- Miller, Foley, Bailey, Campell, Humphries, Christodoulides, Floriano, Simmons, Bhagwandin, Jacobson, Redding, Ebersole, & McDevitt. 2010. Current Development in Salivary Diagnostic. *Biomarkers Med.* 4(1): 1-19.

- Mittal, Bansal, Garg, Atreja, & Bansal. 2011. The Diagnostic Role of Saliva – A Review. *J Clin Exp Dent*. 3(4): 314-320.
- Moriguchi & Fujimoto. 1978. Age-Related Changes in the Content of the Collagen Crosslink, Pyridinoline. *J Biochem*. 84(4): 933-935.
- Mortin, R.F., Hebel, J.R., & Mc Carter, R.J. 2008. *Epidemiologi dan Biostatistika Panduan Studi*. Jakarta: EGC.
- Murray, R.K., Granner, D.K., & Rodwell, V.W. *Biokimia Harper Edisi 27*. Alih Bahasa oleh Nanda Wulandari. 2009. Jakarta: EGC.
- Newman, Takei, Klokkevold, & Carranza. 2006. *Clinical Periodontology 10th Edition*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Oates, T.W., Caraway, D., & Jones, J. 2004. Relation between smoking and biomarkers of bone resorption associated with dental endosseous implants. *Implant Dent*. 13(4): 352-357.
- Pfaffe, Cooper-White, Beyerlein, Kostner, & Punyadeera. 2011. Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications. *Clin Chem*. 57(5): 675-687.
- Pink, Simek, Vondrakova, Faber, Michl, Pazdera, & Indrak. 2009. Salivas As A Diagnostic Medium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 153(2):103–110.
- Prihartanti, V. 2002. *Peranan Saliva sebagai Media Diagnosa*. Skripsi. Medan: Fakultas Kedokteran Gigi USU.
- Puy, C.L. 2006. The Role of Saliva in Maintaining Oral Health and as an Aid to Diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 11:E449-455.
- Rizal, M.I. 2011. Transkriptom Saliva untuk Deteksi Dini Kanker Mulut. *JITEKGI*. 8(2): 32-35.
- Robins, S.P. 1994. Biochemical Markers for Assessing Skeletas Growth. *Eur J Clin Nutr*. 48(1): 199-209.
- Santoso dan Waspadji. 2008. The effect of Non-Surgical Periodontal Therapy on Systemic Immune Response and Blood Glucose Level of NIDDM Patients. *Med J Indones*. 17(1): 20-24.

- Serio, F.G. dan Duncan, T.B. 2009. *The Pathogenesis dan Treatment of Periodontal Disease*. <http://www.ineedce.com>. Diakses tanggal 7 April 2013.
- Springer, Terheyden, Dunsche, Czech, Suhr, Tiemann, Hedderich, & Acil. 2003. Collagen crosslink excretion and staging of oral cancer. *British J Cancer*. 88: 1105-1110.
- Srivastava, Moorthy, Gross, & Barrett. 2013. A Sensitive and Selective Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for Quantitative Analysis of Efavirez In Human Plasma. *PLOS ONE*. 8(6): 1-9.
- Sudjadi. 2012. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Suwandi, T. 2010. Perawatan Awal Penutupan Diastema Gigi Goyang pada Penderita Periodontitis Kronis Dewasa. *Jurnal PDGI*. 59(3): 105-109.
- Taba, Janet, Amy, dan William. 2005. Diagnostic Biomarker for Oral and Periodontal Disease. *Dent Clin North America*. 49(3): 551-556.
- Tanimoto, Imada, Ohno, Sasaki, Honda, & Tanne. 2003. Association between Craniofacial Growth and Urinary Bone Metabolic Markers (Pyridinoline, Deoxypridinoline) in Growing Rats. *J Dent Res*. 82(1): 28-32.
- Tanimoto, Ohno, Imada, Honda, Ohno-Nakahara, Kapila, & Tanne. 2004. Utility of urinary pyridinoline and deoxypyridinoline ratio for diagnosis of osteoarthritis at temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med*. 33(4): 218-223.
- Thomas, S.D.C. 2012. Bone Turnover Markers. *Aust Prescr*. 35(5): 156-158.
- Thorpe, C.T. 2010. *Extracellular Matrix Synthesis And Degradation In Functionally Distinct Tendons*. <http://www.discovery.ucl.ac.uk>. Diakses tanggal 14 April 2013.
- Vesper, Demers, Eastell, Garnero, Kleerekoper, Robins, Srivastava, Warnick, Watts, & Myers. 2002. Assessment and Recommendations on Factors Contributing to Preanalytical Variability of Urinary Pyridinoline and Deoxypyridinoline. *Clin Chem*. 48(2): 220-235.
- Vesper. 2005. Measurement of Pyridinoline and Deoxypyridinoline in Metabolic Bone Disease. *CLI*. 1-2.

- Visse, R. & Nagase, H. 2003. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res.* 92:827-839.
- Wahyukundari, M.A. 2009. Perbedaan Kadar Matrix Metalloproteinase-8 Setelah Scaling Dan Pemberian Tetrasiklin Pada Penderita Periodontitis Kronis. *JURNAL PDGI.* 58(1): 1-6.
- Wilson, T.G. & Kornman K.S. 1996. *Fundamentals of Periodontics.* Carol Stream: Quintessence Publishing.
- Wright, S.A.B. & Steiner, R.D. 2004. Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening: A Primer for Neonatal and Perinatal Nurses. *J Perinat Neonat Nurs.* 18(1): 41-58.
- Xiong, X. 2008. *New Insight into Structure and Function of Type I Collagen.* <http://elib.uni-stuttgart.de>. Diakses tanggal 22 Mei 2013.
- Zia, Khan, Bey, Gupta, Atreja, & Bansal. 2011. Oral Biomarkers in the Diagnosis and Progression of Periodontal Disease. *Biol Med.* 3(2): 314-320.

Lampiran A. *Ethical Clearance*



UNIT ETIKA DAN ADVOKASI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS GADJAH MADA
Sekretariat: Fakultas Kedokteran Gigi UGM Jl. Denta Sekip Utara Yogyakarta
Telp. (0274) 902671

KETERANGAN KELAIKAN ETIK PENELITIAN
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 520/KKEP/FKG-UGM/EC/2013

Setelah Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan:

Judul : **KADAR *PYRIDINOLINE* PADA SALIVA PENDERITA PERIODONTITIS KRONIS**

Peneliti Utama : Putri Kharisma Dewi

Penanggung Jawab Medis : drg. Agustin Wulan Suci D., M.D.Sc.

Unit/Lembaga : FKG Universitas Jember


Tempat Penelitian : RSGM Universitas Jember dan Lab. Kimia Farmasi Universitas Jember

Waktu Penelitian : Oktober 2013 - selesai

Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.

Yogyakarta, 28 Oktober 2013

Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UGM


drg. Suryono, S.H, Ph.D

Lampiran B. Surat Pernyataan Kesediaan Subyek Penelitian (*Informed Consent*)

INFORMED CONSENT

Judul Penelitian : **Kadar *Pyridinoline* pada Saliva Penderita Penyakit Periodontal Inflamatorik**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

1. Calon subyek penelitian

Nama :
 Alamat :
 No KTP/ Identitas :
 Jenis kelamin : Umur : Tahun

2. Peneliti yang memberi informasi penelitian

Nama : Putri Kharisma Dewi
 Alamat : Jl. Mastrip II No.43, Jember
 No. KTP/ Identitas : 3513135110920002
 Jenis kelamin : Perempuan Umur : 21 Tahun

3. Saksi

Nama :
 Alamat :
 No KTP/ Identitas :
 Jenis kelamin : Umur : Tahun

Hubungan saksi dengan calon subyek penelitian (istri/suami/ayah/ibu/anak/saudara) Dengan sesungguhnya dan sejujurnya, telah berdiskusi dan tanya jawab, atas informasi penelitian yang akan dilakukan, yang telah memilih saya sebagai calon subyek penelitian dalam hal:

Mengambil saliva

Menyatakan dengan sesungguhnya, bahwa melalui diskusi informasi penelitian yang akan berlanjut selama masa penelitian, tanpa paksaan, tekanan, dengan kesadaran, dan pemahaman informasi dengan sukarela memberikan : (lingkari pernyataan yang dipilih)

1. PERNYATAAN BERSEKIDIA MENGIKUTI TATA LAKSANA PENELITIAN SEBAGAI SUBYEK PENELITIAN YANG TERPILIH
2. PERNYATAAN MENOLAK MENGIKUTI TATA LAKSANA PENELITIAN

Saksi

.....

Jember,

Subyek penelitian

.....

Peneliti yang memberi informasi

Putri Kharisma Dewi

Lampiran C. Kuesioner Subyek Penelitian

KUESIONER PENELITIAN

Nama :
Umur :
BB/TB :
Alamat :
No. Telepon :

Jawablah pertanyaan-pertanyaan berikut dengan melingkari ya atau tidak

- | | | |
|--|----|-------|
| 1. a. Apakah Anda sedang dalam perawatan dokter? | Ya | Tidak |
| b. Pernahkah Anda dirawat inap di rumah sakit selama lima tahun terakhir? | Ya | Tidak |
| Jika ya, karena apa? | Ya | Tidak |
| 2. Apakah Anda pernah menderita keadaan seperti ini? | | |
| - Diabetes (kencing manis) | Ya | Tidak |
| - Osteoporosis | Ya | Tidak |
| - Kanker | Ya | Tidak |
| - Demam Rematik atau Penyakit Jantung Rematik | Ya | Tidak |
| - Epilepsi atau kejang-kejang | Ya | Tidak |
| - Pembengkakan atau rasa sakit jika ditekan | Ya | Tidak |
| - Kelenjar leher | Ya | Tidak |
| 3. Apakah Anda sedang menjalani fisioterapi?..... | Ya | Tidak |
| 4. Apakah Anda sedang dalam perawatan dokter gigi? | Ya | Tidak |
| Jika ya, perawatan apa yang dilakukan? | Ya | Tidak |
| 5. Apakah Anda pernah membersihkan karang gigi selama 6 bulan terakhir? | Ya | Tidak |
| 6. Apakah Anda sedang mengonsumsi atau menjalani terapi obat-obatan tertentu?..... | Ya | Tidak |
| Jika ya, tuliskan nama obatnya | Ya | Tidak |
| 7. Apakah Anda sedang menjalani perawatan kepada dokter kandungan?..... | Ya | Tidak |
| 8. Apakah Anda sedang hamil? | Ya | Tidak |
| 9. Apakah Anda sedang menstruasi? | Ya | Tidak |
| 10. Apakah Anda menggunakan obat kumur sehari-hari? ... | Ya | Tidak |
| 11. Apakah Anda menggunakan gigi tiruan? | Ya | Tidak |
| 12. Apakah Anda memiliki kebiasaan merokok?..... | Ya | Tidak |
| 13. Apakah Anda memiliki kebiasaan meminum minuman beralkohol?..... | Ya | Tidak |

Lampiran D. Blanko Penelitian

BLANKO PENELITIAN

Judul : Kadar *Pyridinoline* pada Saliva Penderita Penyakit
Periodontal Inflamatorik

Tanggal :

Kode :

Nama :

Tanggal lahir/Umur :

Jenis kelamin :

Alamat :

PI																
Karies																
ATAS	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
BWH	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
Karies																
PI																

Skor PI = _____

Jumlah Karies =

Kadar *Pyridinoline* =

Lampiran E. Data Hasil Penelitian Kadar *Pyridinoline* pada Saliva Penderita Penyakit Periodontal Inflamatorik

KODE	NAMA	UMUR	JML GIGI	JML KARIES	SKOR PI	KRITERIA PI	KADAR PYR
N	Rat	32	32	0	0,63	G	62,87
B	Yul	43	30	0	0,67	G	41,90
F	SH	40	28	0	0,71	G	18,92
C	Vin	36	31	0	0,74	G	49,69
H	Suh	35	30	0	0,84	G	98,76
U	Rus	35	32	1	1,21	AP	98,08
M	Jo	40	32	0	1,41	AP	112,68
V	Am	43	31	0	1,45	AP	20,99
E	Id	40	27	1	1,52	AP	55,64
T	Yu	46	30	0	1,93	AP	54,38
S	Sam	47	28	2	2,00	DP	8,19
O	SS	36	32	2	2,06	DP	115,35
G	Um	30	24	1	2,50	DP	20,30
P	Lid	38	29	1	3,10	DP	20,16
D	Rit	38	27	1	3,48	DP	82,95
Jumlah		579	443	9	-	-	860,86
n		15	15	15	15	15	15
Rata-rata		38,60	29,53	0,60	-	-	57,39
SD		4,84	2,36	0,74	-	-	36,61
Minimum		30	24,00	0,00	-	-	8,19
Maximum		47	32,00	2,00	-	-	115,35

G = gingivitis
 AP = awal periodontal destruktif
 DP = penyakit periodontal destruktif
 PYR = *pyridinoline*
 SD = standart deviasi

Lampiran F. Analisis Data

F.1. Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		KADAR PYR
N		15
Normal Parameters ^a	Mean	57.3907
	Std. Deviation	36.61135
Most Extreme Differences	Absolute	.173
	Positive	.173
	Negative	-.133
Kolmogorov-Smirnov Z		.671
Asymp. Sig. (2-tailed)		.759

a. Test distribution is Normal.

F.2. Uji Homogenitas Levene

Test of Homogeneity of Variances

KADAR PYR

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.612	2	12	.240

F.3. Uji Statistik One-Way Anova

ANOVA

KADAR PYR

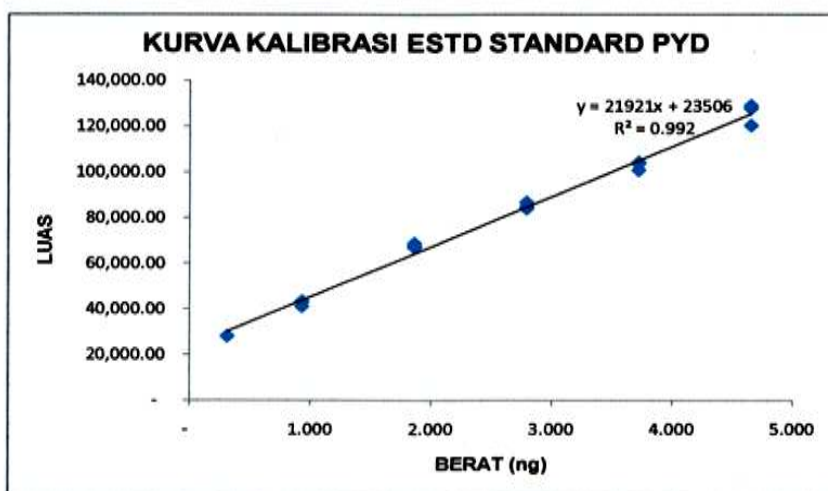
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	964.914	2	482.457	.325	.729
Within Groups	17800.564	12	1483.380		
Total	18765.477	14			

Lampiran G. Rekapitulasi Perhitungan Pengukuran Standar *Pyridinoline*

LABORATORIUM KIMIA ANALISIS DAN INSTRUMENTASI
 JURUSAN TEKNIK KIMIA POLITEKNIK NEGERI MALANG
 JL. SOEKARNO HATTA NO. 9 PO. BOX 04 MALANG 65141

REKAPITULASI PERHITUNGAN PENGUKURAN STANDARD PYD DENGAN ESTD

No	Nama File/Standard	Berat (ng)	Luas
1	SIM_Std_1mkr_1	0.310	28,018.81
2	SIM_Std_3mkr_1	0.930	42,996.31
3	SIM_Std_3mkr_2	0.930	43,337.86
4	SIM_Std_3mkr_3	0.930	41,035.70
5	SIM_Std_6mkr_2	1.860	66,910.14
6	SIM_Std_6mkr_3	1.860	68,744.30
7	SIM_Std_6mkr_4	1.860	67,595.71
8	SIM_Std_9mkr_2	2.790	86,709.57
9	SIM_Std_9mkr_3	2.790	84,747.75
10	SIM_Std_9mkr_4	2.790	83,997.76
11	SIM_Std_12mkr_2	3.720	104,269.26
12	SIM_Std_12mkr_3	3.720	100,881.24
13	SIM_Std_12mkr_4	3.720	103,734.52
14	SIM_Std_75_10mkr_1	4.650	120,372.83
15	SIM_Std_75_10mkr_2	4.650	129,056.95
16	SIM_Std_75_10mkr_3	4.650	127,876.54



Malang, 20 Januari 2014
 Pelaksana,

UNIT PRODI
 JURUSAN TEKNIK KIMIA
 POLITEKNIK NEGERI MALANG
 Kallawan ST
 NIP. 196904081990021001

Lampiran H. Rekapitulasi Perhitungan Pengujian Sampel *Pyridinoline*

No	Nama File/Sampel	Luas	Berat TKR (ng)	Vol. Injeksi (μ L)	Berat THT (ng)	FP	Hasil (ppm)
1	SIM_B_2	69.429,63	2,095	0,10	20,95	2	41,90
2	SIM_C_2	77.971,93	2,485	0,10	24,85	2	49,69
3	SIM_D_2	114.422,17	4,147	0,10	41,47	2	82,95
4	SIM_E_2	84.493,95	2,782	0,10	27,82	2	55,64
5	SIM_F_2	44.246,37	0,946	0,10	9,46	2	18,92
6	SIM_G_2	45.750,93	1,015	0,10	10,15	2	20,30
7	SIM_H_2	131.750,76	4,938	0,10	49,38	2	98,76
8	SIM_M_2	147.004,18	5,634	0,10	56,34	2	112,68
9	SIM_N_2	92.419,82	3,144	0,10	31,44	2	62,87
10	SIM_O_2	149.929,79	5,767	0,10	57,67	2	115,35
11	SIM_P_2	45.603,26	1,008	0,10	10,08	2	20,16
12	SIM_S_2	14.527,25	-0,410	10,00	-0,04	200	8,19
13	SIM_T_2	53.309,77	1,360	5,00	0,27	200	54,38
14	SIM_U_2	77.255,33	2,452	5,00	0,49	200	98,08
15	SIM_V_2	46.513,34	1,050	0,10	10,50	2	20,99

THR = Terukur

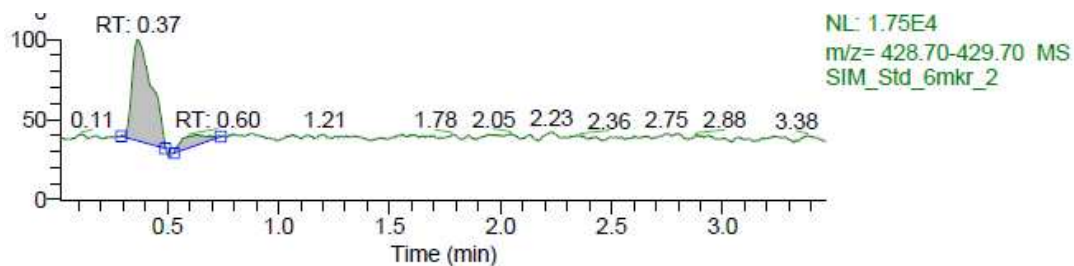
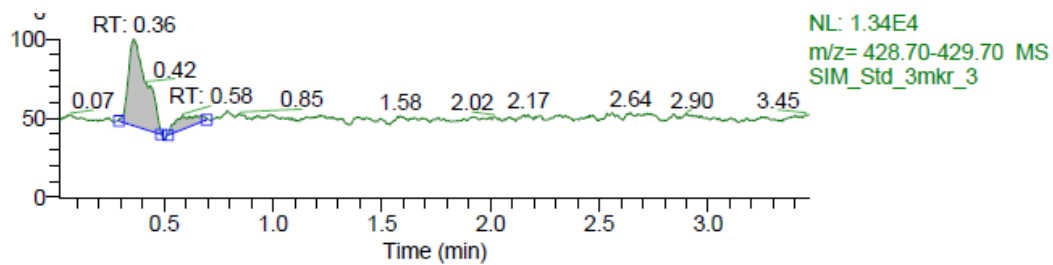
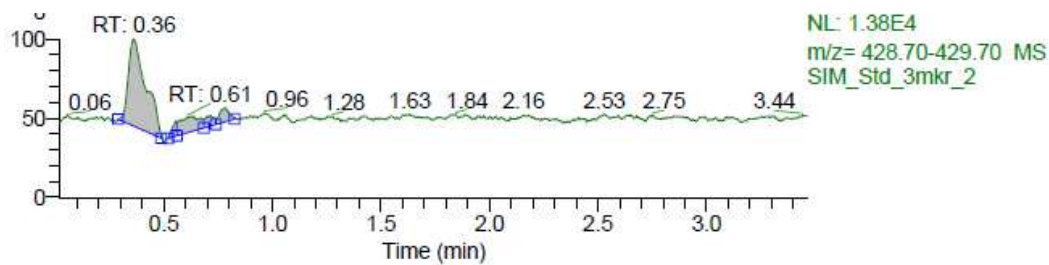
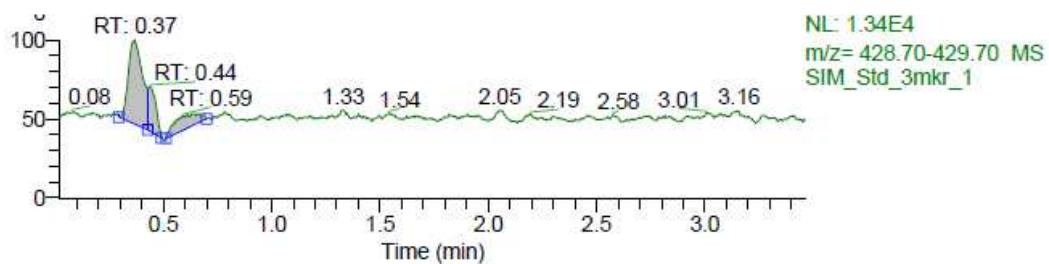
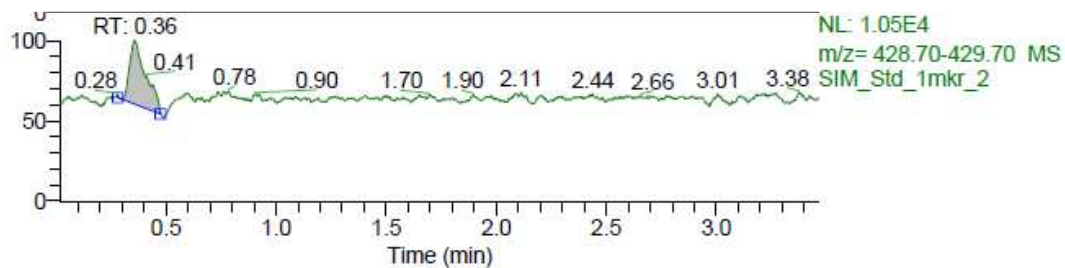
THT = Terhitung

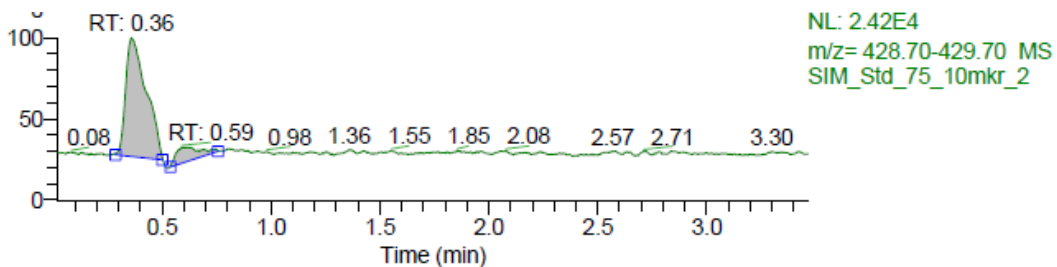
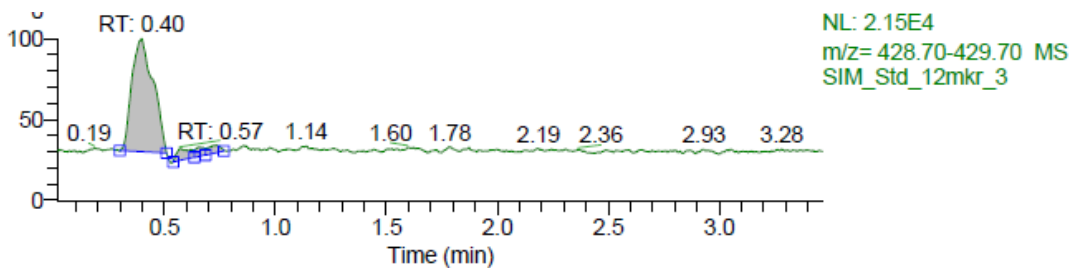
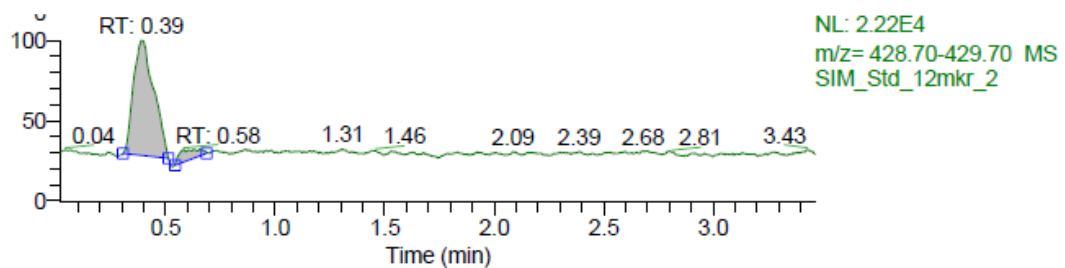
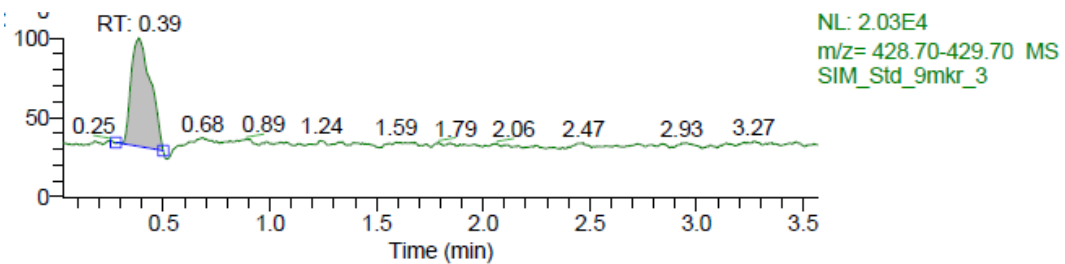
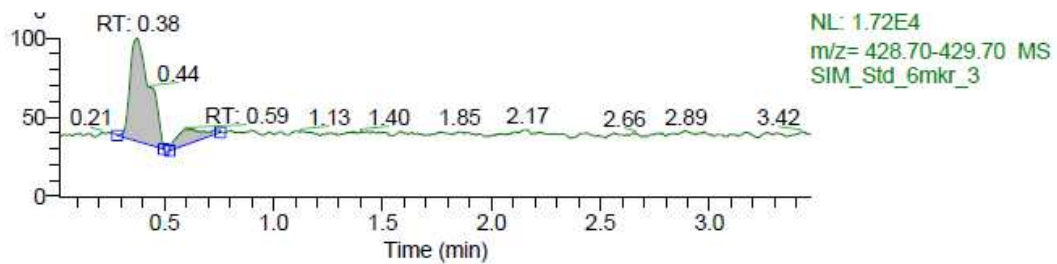
FP = Faktor Pengenceran

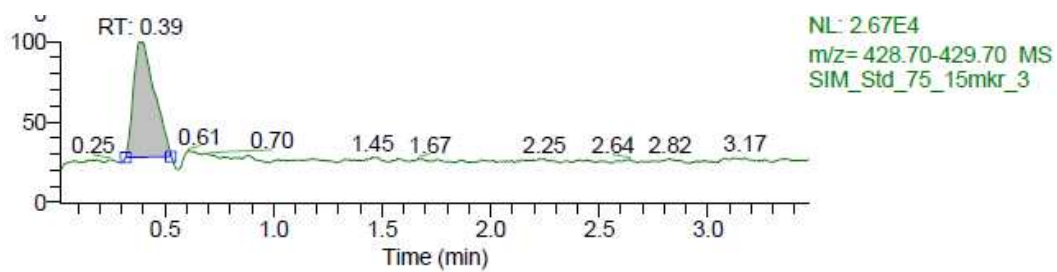
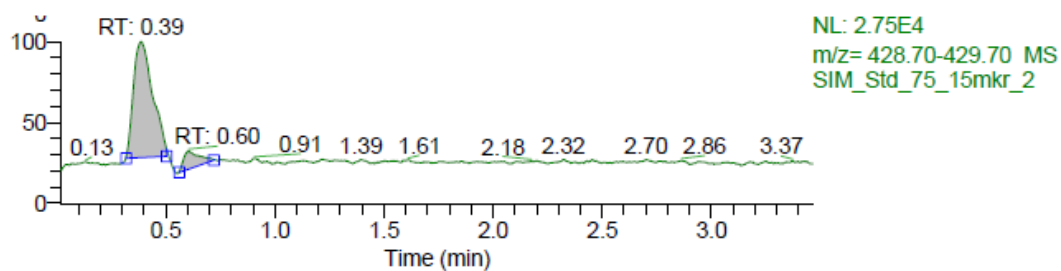
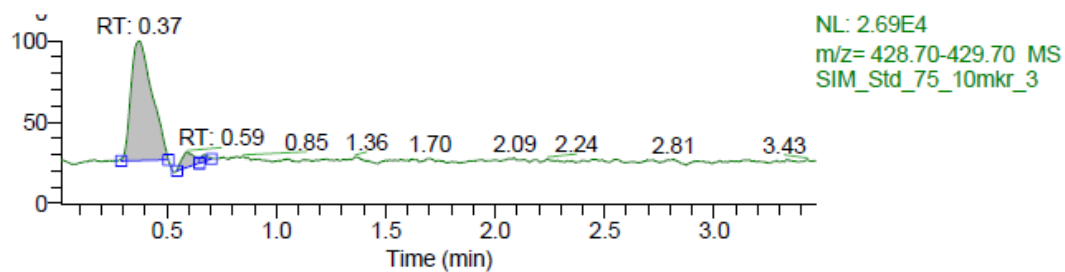
$$\text{ppm} = \frac{\text{THR}}{\text{vol. injeksi}} \times \text{FP}$$

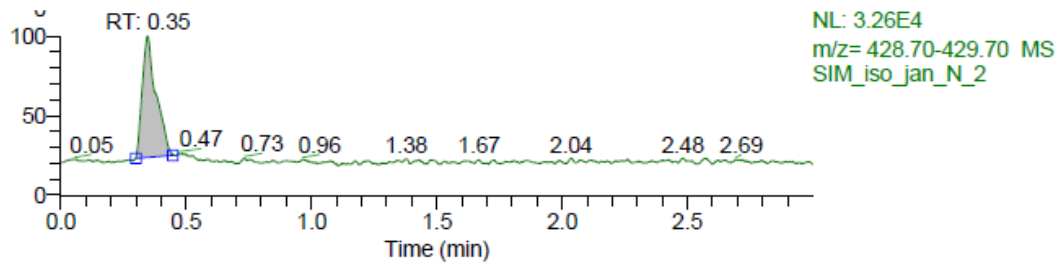
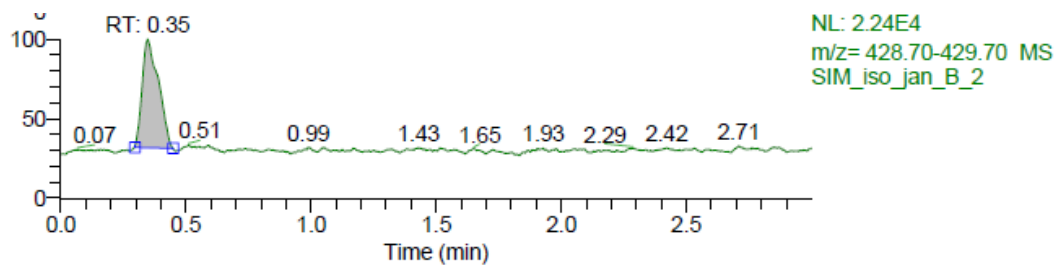
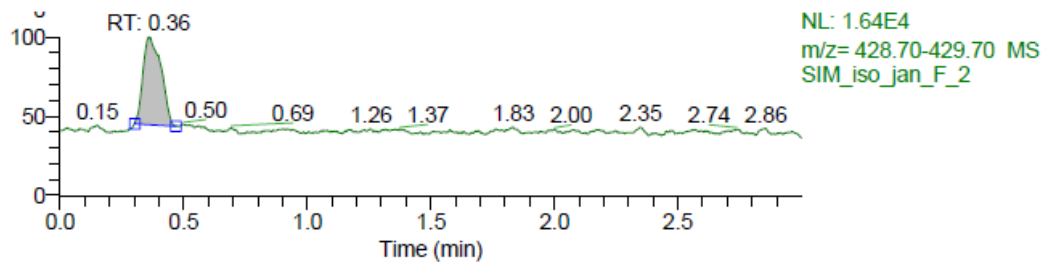
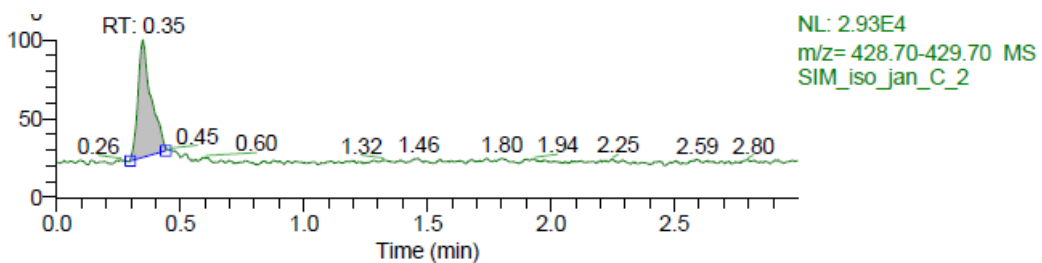
Malang, 20 Januari 2014
 Pelaksana

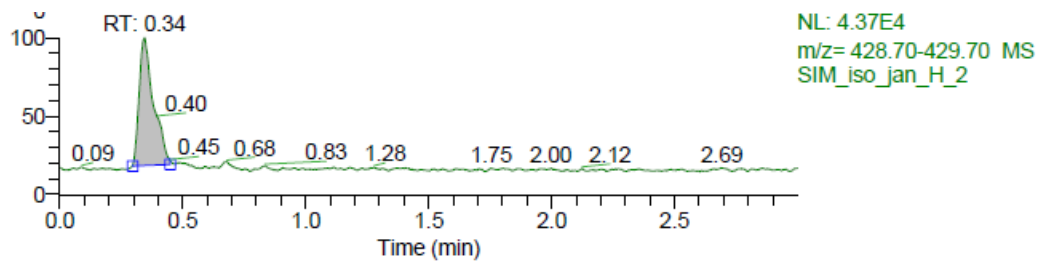
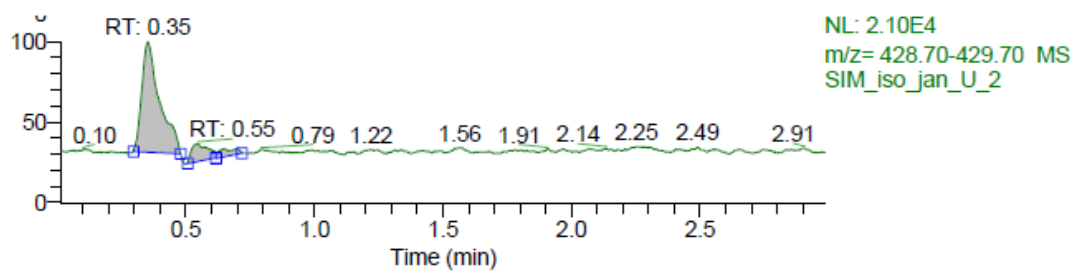
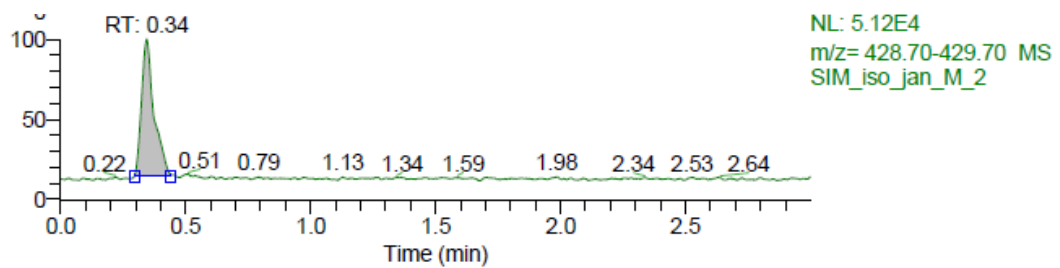
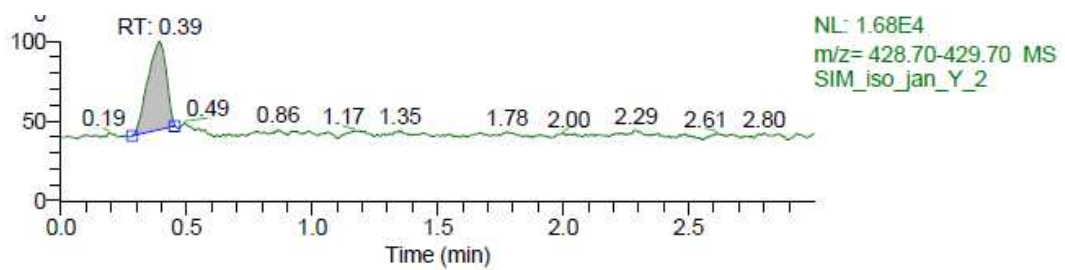
 Kaliawan, ST
 NIP. 196904081990021001

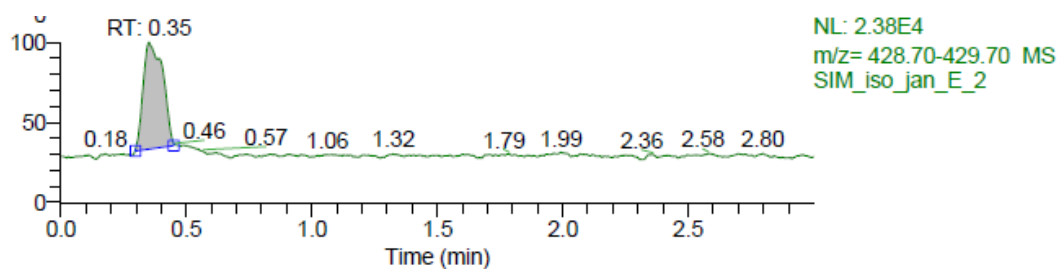
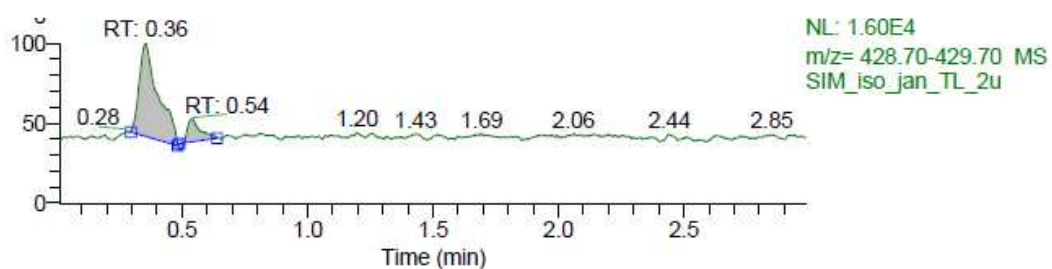
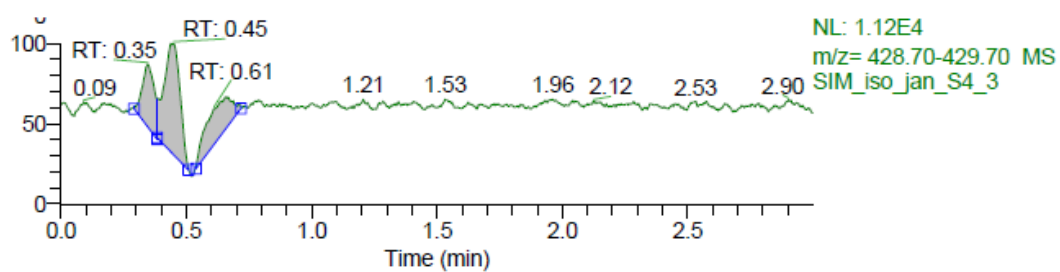
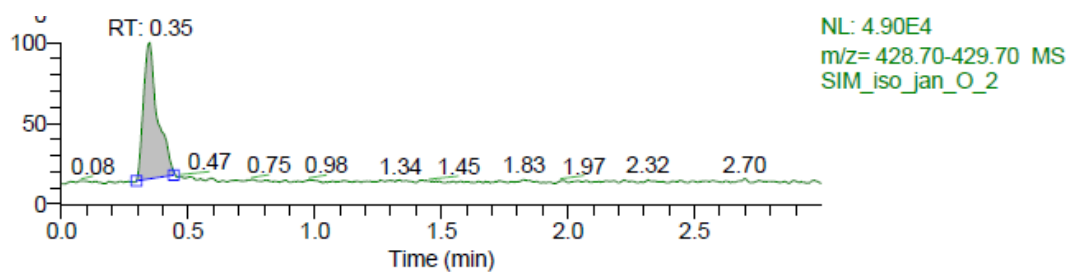
Lampiran I. Kurva Standar *Pyridinoline*

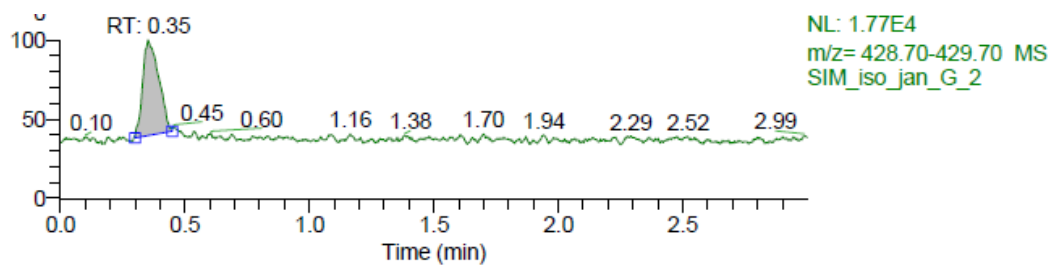
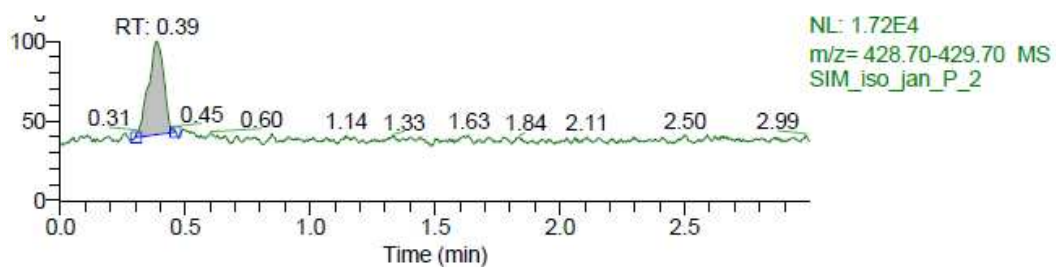
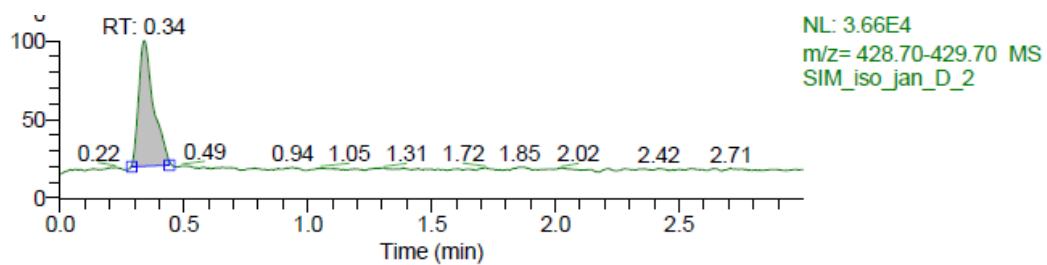




Lampiran J. Kurva *Pyridinoline* pada Saliva Penderita Penyakit Periodontal**Sampel N****Sampel B****Sampel F****Sampel C**

Sampel H**Sampel U****Sampel M****Sampel V**

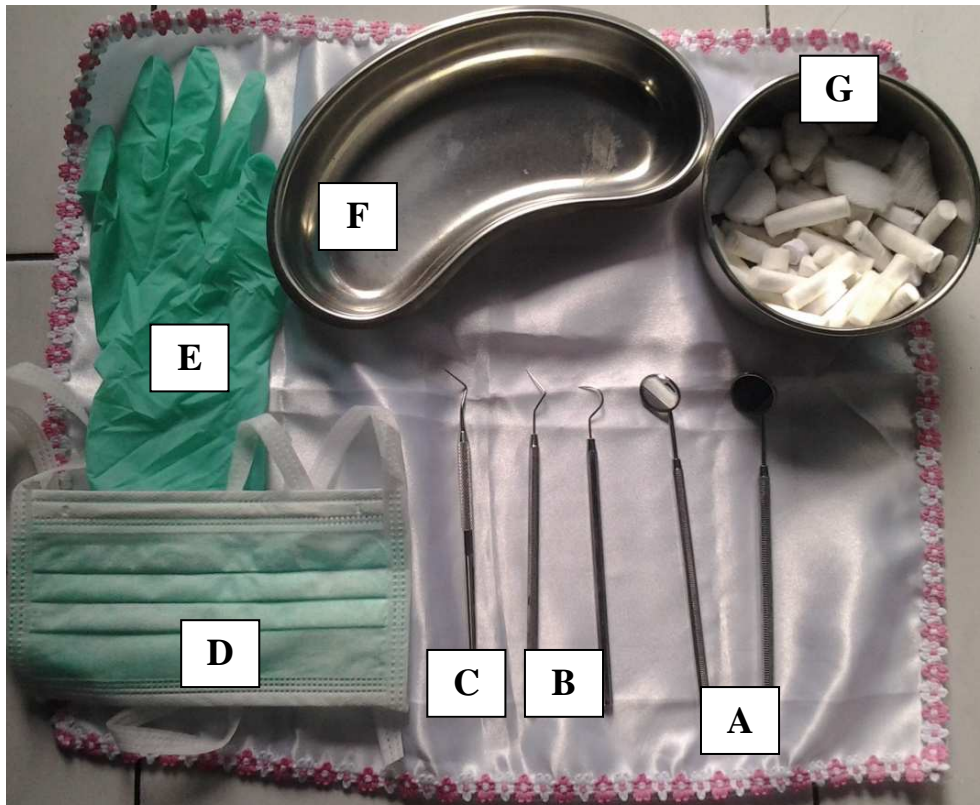
Sampel E**Sampel T****Sampel S****Sampel O**

Sampel G**Sampel P****Sampel D**

RT = *retention time*

NL = kepekaan/intensitas

m/z = massa per satuan muatan atom (berat molekul *pyridinoline*)

Lampiran K. Foto Penelitian

(A) Kaca mulut; (B) Sonde; (C) Probe WHO; (D) Masker; (E) Handscoon; (F) Neerbecken; (G) Cotton Roll dan Tampon

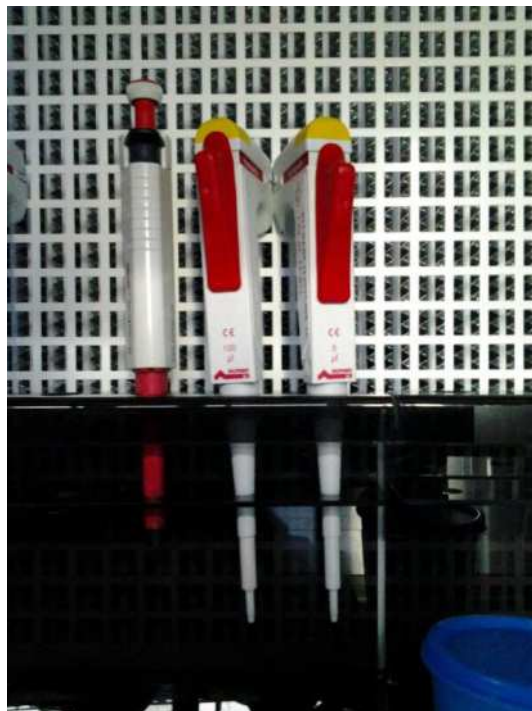
Gambar K.1. Alat Pemeriksaan Rongga Mulut



Gambar K.2. Pot Saliva



Gambar K.3. Eppendorf



Gambar K.4. Mikropipet



Gambar K.5. Deep Freezer



Gambar K.6. Alat Penyaringan Sampel Saliva (*Syringe* dan Filter Nylon)



Gambar K.7. Kolom UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*)



Gambar K.8. Standar *Pyridinoline* Kalibrator



Gambar K.9. LC-MS/MS (UHPLC dan MS/MS)



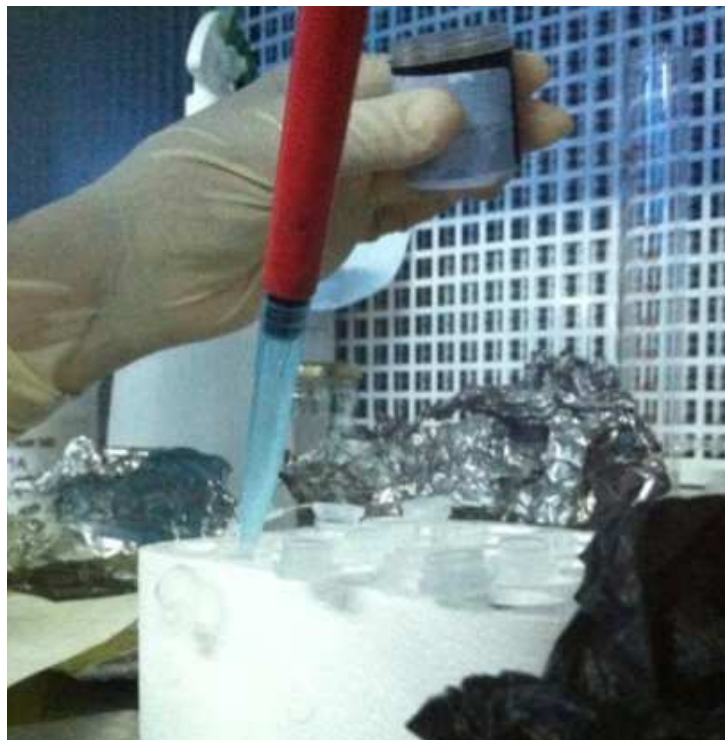
Gambar K.10. Komputer (Perekam Hasil Analisis Kadar *Pyridinoline*)



Gambar K.11. Pemeriksaan Rongga Mulut Subyek Penelitian



Gambar K.12. Foto Periapikal Subyek Penelitian dengan Skor 4



Gambar K.13. Pemandahan Saliva dari Pot Saliva ke Eppendorf



Gambar K.14. Pengenceran Saliva Menggunakan Aquabides



Gambar K.15. Penyaringan Saliva menggunakan Filter Nilon



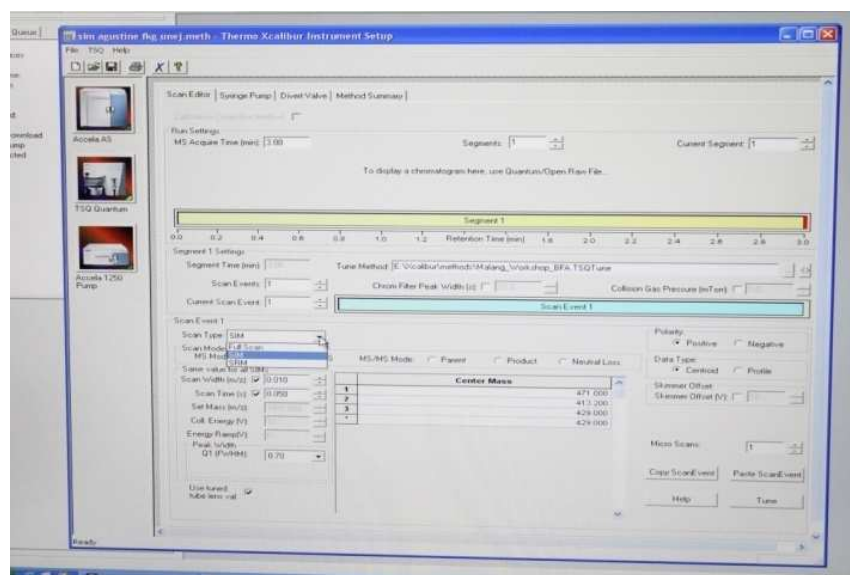
Gambar K.16. Meletakkan Sampel Saliva ke Tempat Sampel untuk Pengukuran Menggunakan LC-MS/MS



Gambar K.17. Peletakan Sampel pada Tempat Sampel (Autoinjeksi)



Gambar K.18. Persiapan LC-MS/MS untuk Beroperasi



Gambar K.19. Pengaturan pada Komputer Menggunakan Software LC Quan untuk Proses Analisis Kadar *Pyridinoline* Saliva Menggunakan LC-MS/MS