

Naskah Publikasi

PENINGKATAN HSP-60 dan Hsp-90 PADA SPM-LP SPRAQUE-DAWLEY DALAM KONDISI DISTRES KERJA KRONIS

Oleh:

Zahreni_Hamzah

FKG Universitas Jember

Email: zahreni.hamzah@gmail.com

ABSTRACT

High psychological and physical distress work can stimulates cellular and tissue damage by corticosterone secretion, included in periodontal cells and tissues. If this conditions not receives suitable treatment, it alters tooth mobility or premature loss. For maintaining body homeostasis, the cells and tissues will responses with many mechanism to prevent cells and tissue damage, ie by HSP-60 and HSP-90. HSP-60 and HSP-90 have been shown to play pro- and anti-apoptotic roles, respectively. The objective of this research is to determine the role of HSP-60 and HSP-90 on the periodontal ligament stem cells/PDLSC (multipotent periodontal cells) related to distress work. The results of this research are expected to obtain information about (a) the role of corticosterone in production HSP-60 and HSP-90 protein, (b) the role of HSP-60 and HSP-90 to repair cell damage in chronic labor distress. The Conclusions are (1) increase corticosteroids (Elisa) in psychological and psychophysical distress work due to increasing production HSP-60 and HSP-90 on PDLSC (IHC), (2) increasing in the expression of HSP-60 resulting in a decrease in the number of fibroblasts (HE).

Key Words: *Distress, PDLSC, HSP-60, HSP-90, Fibroblast*

PENDAHULUAN

Distres (stress yang merugikan) kerja dapat menimbulkan respon biologis melalui stimulasi aksis HPA, dan menghasilkan pelepasan kortikosteron yang tinggi pada tikus. Kortikosteron selain berfungsi untuk perbaikan sel, ia juga dapat merusak sel dan jaringan, karena sifatnya yang pro-inflamatori dan pro-apoptosis. Bila distres kerja tidak segera diatasi akan menyebabkan kerusakan jaringan, termasuk pada jaringan periodontal, yang mengakibatkan terjadinya kegoyangan/mobilitas gigi, dan lepasnya gigi secara prematur.^{1,2}

Efek kortisteron pada sel sasaran adalah mampu (1) menyandi/mengaktifkan gen spesifik di dalam sel sasaran; (2) memicu sintesis protein sel baru dengan menghasilkan mRNA komplementer, yang ditranslokasikan ke plasma dan berikatan dengan ribosom, tempat yang memperantarai penyusunan protein baru; (3) menghasilkan respon fisiologis tertentu pada sel sasaran melalui protein baru yang dihasilkan; (4) menstimulasi jalur anti-stres dan anti-inflamasi yang berguna untuk mempertahankan homeostasis.^{3,4}

Kerusakan sel dan jaringan periodontal secara fisiologis akan diganti secara proporsional dengan pembentukan sel baru yang diregulasi secara cermat dan tepat oleh sel punca mesensimal ligamen periodontal/SPM-LP (dikenali dengan marker Stromyelin-1/Stro-1, CD146 dan CD44).^{5,6} SPM-LP merupakan sel multipoten yang mampu memperbanyak diri dan meregenerasi sel dental, seperti: sel fibroblas, osteoblas, dan sementoblas, sehingga homeostasis jaringan dapat terjaga.^{7,8} Namun, selama distres kerja, sering dijumpai kerusakan jaringan periodontal yang tidak diikuti dengan penggantian sel dan jaringan yang memadai. Hal ini diduga terjadi karena hambatan pada aktivitas biologis SPM-LP. Hambatan ini diduga terjadi akibat Hsp-60 dan Hsp-90, sebagai protein yang bertanggung jawab terhadap pelipatan protein seluler yang mengalami *misfolded* atau *unfolded*; dan menjadi aktif ketika kondisi selular memburuk.⁷

Kortisol dalam jumlah yang cukup besar $\pm 90\%$ berada dalam kondisi terikat ($\pm 90\%$ pada α -globulin; $\pm 15\%$ lainnya terikat lebih lemah pada albumin), sisanya hanya 5-10% yang aktif secara metabolik dan beredar dalam bentuk bebas. Efek kortikosteron pada sel sasaran adalah mampu (1) menyandi/ mengaktifkan gen spesifik di dalam sel sasaran; (2) memicu sintesis protein sel baru dengan menghasilkan mRNA komplementer, yang ditranslokasikan ke plasma dan berikatan dengan ribosom, tempat yang memperantarai penyusunan protein baru; (3) menghasilkan respon fisiologis tertentu pada sel sasaran melalui protein baru yang dihasilkan; (4) menstimulasi jalur anti-stres dan anti-inflamasi yang berguna untuk mempertahankan homeostasis.⁸

Rumusan masalah penelitian ini adalah (1) Apakah peningkatan ekspresi Hsp-60 dan HSP-90 pada SPM-LP terkait dengan peningkatan kadar kortikosteron dan lama distres kerja; (2) Apakah peningkatan kortikosteron mempengaruhi penurunan jumlah fibroblas?;

Tujuan umum penelitian ini adalah menentukan peran Hsp-60 dan Hsp-90 pada sel punca mesensimal ligamen periodontal terkait dengan distres kerja. Sedangkan, tujuan khusus penelitian ini adalah (1) Apakah peningkatan ekspresi Hsp-60 pada SPM-LP terkait dengan peningkatan kadar kortikosteron dan lama distres kerja; (2) Apakah peningkatan ekspresi Hsp-90 pada SPM-LP terkait dengan peningkatan kadar kortikosteron dan lama distres kerja?; (3) Apakah peningkatan jumlah kortikosteron mempengaruhi penurunan jumlah SPM-LP?; dan (4) Apakah lama distres kerja mempengaruhi penurunan jumlah SPM-LP?

Hasil penelitian ini dapat menjelaskan regulasi pengaturan daya tahan jaringan melalui SPM-LP sebagai sel progenitor terhadap stimulasi yang merusak sel akibat distres kerja. Dengan demikian, penelitian dalam disertasi ini tidak hanya menjelaskan mekanisme kerusakan sel SPM-LP tetapi dapat juga memberi informasi tentang mekanisme perbaikannya.

Kontribusi penelitian penelitian ini antara lain: (1) sebagai dasar pengembangan pengobatan regenerasi sel dan jaringan periodontal dengan Hsp-60 dan Hsp-90, khususnya dalam kasus distres;

dan (2) memberi informasi bahwa di masa yang akan datang, pengobatan tidak hanya ditujukan untuk sel yang telah matur saja, tetapi perlu dilakukan juga terhadap SPM-LP, sebagai sel induk/prognitor yang mampu menghasilkan sel dental lain (fibroblas, osteoblas, dan sementoblas), agar keberhasilan terapi maksimal.

KAJIAN LITERATUR

Distres kerja (stres kerja yang merugikan) adalah suatu bentuk konsekuensi pekerjaan yang tidak dapat dihindai, yang bisa saja menimpa setiap karyawan di tempat kerja. Distres kerja mendefinisikan sebagai suatu proses yang menyebabkan orang merasa sakit, tidak nyaman atau tegang karena pekerjaan, tempat kerja atau situasi kerja tertentu. Tuntutan yang terus menerus menekan tenaga kerja menuntut penyesuaian diri yang tinggi dan cepat pada tenaga kerja. Stresor yang menimbulkan distres kerja dapat bersifat psikis maupun fisik.⁹ Destila (2012) menyatakan bahwa orang yang bekerja di atas 10 jam sehari tergolong rentan terhadap berbagai penyakit (antara lain: penyakit jantung, penyakit periodontal), dan orang yang bekerja rata-rata 19 jam per hari dilaporkan dapat menimbulkan kematian.¹⁰

Respon jaringan terhadap stresor dapat berupa perubahan seluler dan molekuler. Perubahan biomolekuler terhadap stresor akut berbeda dengan stresor kronis. Stresor akut (terjadi dalam beberapa menit-jam), stres psikologis ringan atau selama latihan fisik tertentu yang diaktivasi adalah sistem simpatis (terutama NE), sedang pada stres kronis (terjadi dalam beberapa hari-bulan), stres psikologis berat atau terpapar stresor fisik berat, diaktivasi adalah aksis HPA, yang selanjutnya mengakibatkan gangguan pada sistem imunologis dan proses plastisitas pada jaringan, termasuk jaringan periodontal.¹ Salah satu bentuk kerusakan periodontal akibat distres adalah kegoyangan/mobilitas gigi, yang dapat berlanjut dan menyebabkan kehilangan gigi secara prematur. Prevalensi penyakit periodontal oleh karena distres dilaporkan mencapai 44%-54%.¹¹⁻¹³ Distres kerja dapat menimbulkan respon biologis melalui stimulasi aksis HPA, dan menghasilkan pelepasan kortikosteron yang tinggi pada tikus. Kortikosteron selain berfungsi untuk perbaikan sel, juga dapat merusak jaringan, karena dapat mengaktivasi bahan biokimiawi yang bersifat pro-inflamatori dan pro-apoptosis.⁸ Kompleks kortisol-reseptor nukleus berfungsi mengaktifkan transkripsi gen tertentu. Di dalam nukleus, kompleks ini akan mengalami proses transaktivasi, berikatan dengan *hormone-responsif elements/HRE* atau *glucocortikoid respons elements* (GRE) pada promoter region pada homodimer atau heterodimer.¹⁷ Meskipun sel memiliki jumlah reseptor GR terbatas, aksi yang ditimbulkan oleh sel setelah menerima sinyal ternyata cukup kompleks. Jika ligan terikat tepat dengan reseptornya, sel akan menerima sinyal, yang pada akhirnya akan ditransduksi di dalam sel untuk menghasilkan aksi sel. Selain mengaktivasi,

reseptor steroid juga memiliki sifat represif pada ekspresi gen. Bila domain transaktivasi (AF) disembunyikan maka transkripsi akan menjadi tidak aktif.³

Kerusakan sel dan jaringan periodontal secara fisiologis akan diganti secara proporsional dengan pembentukan sel baru yang diregulasi secara cermat dan tepat oleh sel punca mesensimal ligamen periodontal/SPM-LP.¹⁴ SPM-LP mampu memperbarui diri dan meregenerasi sel dental, menjadi sel yang dewasa seperti: sel fibroblas, osteoblas, dan sementoblas, untuk menjaga homeostasis jaringan periodontal. Namun, selama terjadi distress kerja kronis, sering dijumpai kerusakan jaringan periodontal progresif, tidak diikuti dengan penggantian sel dan jaringan yang memadai. Hal ini diduga karena hambatan pada aktivitas biologis SPM-LP akibat *heat shock protein/Hsp-60* dan *Hsp-90*, sebagai protein yang bertanggung jawab terhadap pelipatan protein seluler yang mengalami *misfolded* atau *unfolded*; dan menjadi aktif ketika kondisi selular memburuk.¹⁵ SPM-LP dilaporkan merupakan faktor kunci untuk keberhasilan proses regenerasi jaringan periodontal. SPM-LP tidak hanya penting untuk pembentukan dan pemeliharaan jaringan, tetapi juga untuk perbaikan, *remodeling* dan regenerasi jaringan ligamen periodontal.¹⁸

Pada saat terjadi distress kerja, kortikosteron akan disekresi dalam jumlah yang cukup banyak.⁸ Reseptor kortikosteron yang dikenal adalah *mineralocorticoid/MR* dan *glucocorticoid/GR*. Pada stres akut, MR akan terangsang lebih dahulu, karena afinitas glukokortikoid pada MR sangat tinggi pada konsentrasi kortisol yang rendah. Sedangkan, pada stres kronis maka GR yang lebih berperan.⁴ Efek kortikosteron pada sel sasaran adalah mampu (1) menyandi/ mengaktifkan gen spesifik di dalam sel sasaran; (2) memicu sintesis protein sel baru dengan menghasilkan mRNA komplementer, yang ditranslokasikan ke plasma dan berikatan dengan ribosom, tempat yang memperantarai penyusunan protein baru; (3) menghasilkan respon fisiologis tertentu pada sel sasaran melalui protein baru yang dihasilkan; (4) menstimulasi jalur anti-stres dan anti-inflamasi yang berguna untuk mempertahankan homeostasis.^{4,8}

Heat shock protein merupakan gabungan dari beberapa protein yang berbeda, yang dapat menghasilkan fungsi yang spesifik. Respon HSP meningkat terhadap stres, sehingga dikenal sebagai protein stres. HSP sangat dibutuhkan oleh protein yang tidak mampu melipat membentuk struktur tersier yang benar, agar mampu melakukan aktivitasnya secara alami. *Heat shock protein* dapat berfungsi sebagai chaperon. Diantara beberapa HSP yang dikenal sebagai stress protein adalah HSP-60 dan Hsp-90. HSP-60 mampu memperbaiki sel dengan membantu pelipatan protein yang mengalami *misfolded* dan atau *unfolded*. Di sisi lain, ia juga dapat mempercepat maturasi procaspase-3 yang berperan sebagai aktivator apoptosis. Sedangkan HSP-90, sebagai molekul chaperon, ia berfungsi menstabilisasi *misfolded proteins* dan meregulasi aktivitas protein sinyal, reseptor hormon steroid dan *tyrosin kinase*. Selain mempunyai peran ganda untuk transportasi kortikosteron ke inti untuk memicu

transkripsi protein baru untuk perbaikan jaringan, ia, juga mempunyai kemampuan untuk degradasi protein.¹⁶ Pada saat tidak ada hormon kortikosteron/steroid, reseptor kortikosteron/ glukokortikoid (GR) pada sel matur akan berikatan dengan *heat shock protein 90* (Hsp-90).¹⁷

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan sejak bulan Maret hingga bulan Nopember 2014. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan desain '*saperate pretest-postest control group design*'. Penelitian ini menggunakan 2 variabel, yaitu variabel jenis stresor dan lama pemberian stresor. Penelitian ini menggunakan tikus Sprague-Dawley jantan, umur 2-3 bulan sebagai model distres kerja, yang telah diijinkan dalam uji etik hewan coba. Tikus yang dibagi dalam 3 kelompok (kontrol (4 sub-kelompok; 0, 7, 14 dan 28 hari), stresor psikologis (3 sub-kelompok; 7, 14 dan 28 hari), stressor psikologis dan fisik (7, 14 dan 28 hari). Masing-masing sub-kelompok terdiri dari 8 ekor (N=80 ekor). Stresor psikologis dan psikologis-fisik dilakukan menggunakan dengan *homemade foot-shock generator* (48 V; 0,5 Hz; 2 mA), dibuat oleh Tim dari Fakultas Teknik Jurusan Elektro Universitas Jember.

Penelitian dilakukan secara *in-vivo*. Analisis data yang dilakukan adalah (1) mengukur kadar kortikosteron sesudah perlakuan dengan Elisa; (2) menghitung jumlah SPM-LP (dengan marker *stromyelisin-1/Stro-1*) yang mengekspresi Hsp-60 dan Hsp-90 (dengan *double-staining* IHK); (3) menghitung jumlah sel matur (fibroblas, osteoblas, dan sementoblas). Sedang, analisis statistik dilakukan dengan Anova dengan tingkat kepercayaan 95%.

Tikus strain Sprague-Dawley diperoleh dari Laboratorium Hewan di FK UGM. Tikus ditempatkan dalam kandang polikarbonat dengan siklus standar gelap-terang masing-masing 12 jam, pada suhu kamar, dan diberi diet pakan standar, air minum diambil dari air PDAM *ad-libitum*. Seluruh prosedur penelitian dan perlakuan hewan disesuaikan dengan pedoman yang ditetapkan dan disetujui oleh komisi etik penelitian hewan coba dari FKH Universitas Airlangga Surabaya. Seluruh tikus di aklimatisasi sesuai dengan kondisi laboratorium seminggu sebelum dilakukan penelitian. Tikus dengan stresor psikologis/PS (n=24 ekor) dan kontrol (n=32 ekor) tidak mendapatkan stresor renjatan listrik/*foot shock*, Sedang, tikus stresor psikologis dan fisik PSF (n=24 ekor) memperoleh perlakuan renjatan listrik pada kakinya.

Stres psikologis diinduksi menggunakan komunikasi antar kotak. Ukuran kotak adalah (64 x 64 x 16 cm) yang dibuat dengan ketebalan 5 mm dengan papan plastik transparan. Lantainya dibuat dari susunan jala kawat *stainless steel* 3 mm yang dialiri aliran listrik. Kotak tersebut dibagi dalam 16 kotak kecil (16 x 16 cm), yang dipisahkan oleh dinding plastik transparan. Di bagian dasar diberi kawat *stainless* berdiameter 5 mm, yang diletakkan berjajar dengan jarak 0,3 cm, yang dipergunakan

untuk mengalirkan aliran listrik (Huang *et al.*, 2010; Ly *et al.* 2012). Tikus yang diberi stresor berupa renjatan listrik (stress psikologis+fisik) diletakkan pada kotak dengan lantai yang diberi aliran listrik (tanpa landasan plastik). Sumber listrik berasal dari *electric foot-shock generator* (48 V; 0,5 Hz; 2 mA) yang dialirkan setiap 2 detik, selama 30 menit, setiap pagi pada pukul 8.00-9.00 setiap hari. Pada hari ke 0, 7, 14 dan 28 hari tikus dikorbankan dengan inhalasi ether, 30-60 menit setelah dilakukan perlakuan. Darah diambil sebanyak 5 ml intracardial. Darah segera disentrifuge dengan sentrifuge dingin pada suhu 4°C selama 30 menit pada 3000 rpm untuk diambil serumnya. Serum disimpan pada suhu -20°C sampai dilakukan analisis hormon kortikosteron. Level kortisol diukur dengan menggunakan analisis Elisa. Pemeriksaan kortikosteron dilakukan di laboratorium Biomedik Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Jember menggunakan Rat Corticosterone Elisa Kit (Ausmausco Pharma Co. Ltd) secara duplo. Sedangkan, prosedur yang digunakan disesuaikan dengan instruksi pabrik.

Prosedur persiapan jaringan periodontal dilakukan sebagai berikut: (a) rahang tikus diambil dan difiksasi dengan larutan normal buffer formalin 10% selama 24 jam; (b) spesimen didemineralisasi dengan larutan *ethylenediaminetetra-acetic acid*/EDTA 15% selama 4-6 minggu pada temperatur kamar; larutan diganti setiap 2-3 hari dengan pengocokan, (c) penanaman dalam blok parafin; (d) pemotongan jaringan dilakukan dengan mikrotom dalam arah longitudinal (2-3 mm mesial M1 sampai 2-3 mm distal M3) setebal 5 µm; (e) pengecatan dilakukan dengan pengecatan standar Hematoksi-Eosin, Imunohistokimia dengan pengecatan ganda. (f) pemeriksaan histologi dan pembacaan jumlah sel dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x, dan dilakukan pengambilan gambar dengan bantuan Optilab.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis data penelitian dikelompokkan dalam beberapa pengamatan. Pengamatan dalam penelitian meliputi: (1) Jumlah fibroblast pada trifurkasi gigi molar tikus Sprague Dawley (pengecatan Hematoksin Eosin), (2) kadar kortikosteron (Elisa), (3) jumlah sel punca mesensimal ligament periodontal (SPM-LP) yang mengekspresi HSP-60, dan (4) jumlah sel punca ligament periodontal yang mengekspresi HSP-90.

Berdasarkan perhitungan jumlah sel fibroblast menunjukkan bahwa tikus yang mengalami distress menunjukkan penurunan jumlah sel. Penurunan terbesar terjadi pada tikus yang mengalami distress psikologis, dibandingkan dengan tikus yang mengalami distress psikologis dan fisik.

Hasil uji Elisa pada tikus sprague Dawley yang direnjat dengan stresor renjatan listrik di kaki dapat meningkatkan sekresi kortikosteron hingga level yang sangat tinggi. Berdasarkan angka rerata sekresi kortikosteron pada serum menunjukkan perlakuan stresor stress psikologis+fisik (SPF) lebih tinggi dibandingkan dengan Stres psikologis.

Jumlah SPM-LP yang mengekspresi HSP-60 dan HSP-90 mengalami peningkatan. Hal ini menunjukkan bahwa SPMLP yang mengalami proses menuju kematian sel meningkat, sehingga kecepatan untuk membentuk sel dewasa seperti fibroblast, osteoblas dan sementoblas menurun. Peningkatan jumlah SPM-LP yang mengekspresi HSP-60 terutama terjadi pada tikus yang diberi perlakuan stresor psikologis dan fisik. Sedang, jumlah SPM-LP yang mengekspresi HSP-90/anti-apoptotik, menunjukkan peningkatan. Peningkatan ini merupakan respon tubuh dalam mempertahankan homeostatik sel dan jaringan tubuh. Peningkatan jumlah SPM-LP yang mengekspresi HSP-90 terjadi baik pada tikus yang diberi perlakuan stresor psikologis maupun stressor psikologis+fisik.

Sesuai kondisi penelitian sebagaimana tercantum di atas terlihat bahwa hormon kortikosteron, sebagai hormon stress dapat memberikan respon imun yang besar dalam peningkatan ekspresi HSP-60 sebagai pro-apoptotik dan HSP-90 sebagai anti-apoptotik. Peningkatan ekspresi protein HSP-60 dan HSP-90 pada SPM-LP sangat diperlukan dalam pengaturan keseimbangan jumlah sel di dalam tubuh. Pengaturan homeostatik jaringan tidak hanya melibatkan HSP-60 dan HSP-90, tetapi secara keseluruhan membutuhkan koordinasi dari berbagai sinyal biokimiawi tubuh untuk meningkatkan komunikasi antar sel, khususnya komunikasi sel di dalam rongga mulut.

Sebagaimana diketahui SPM-LP merupakan sel multipoten yang mampu berdiferensiasi menjadi beberapa macam sel dewasa, seperti fibroblast yang sangat diperlukan untuk membentuk sabut kolagen dalam ligament periodontal. Bilamana SPM-LP terinduksi oleh hormon stress untuk mengalami apoptosis, maka pembentukan kolagen, sebagai pemegang gigi agar tetap berada diposisinya, semakin berkurang. Kondisi ini mengakibatkan gigi mudah goyang. Bila kondisi berlanjut dapat menimbulkan kehilangan gigi secara prematur.

HSP-60 dan HSP-90 merupakan molekul chaperon yang berfungsi menstabilisasi *misfolded proteins* dan meregulasi aktivitas protein sinyal, reseptor hormon steroid dan *tyrosin kinase* . Selain mempunyai peran ganda untuk transportasi kortikosteron ke inti untuk memicu transkripsi protein baru untuk perbaikan/regenerasi jaringan, HSP juga mempunyai kemampuan untuk degradasi protein, dengan cara mempercepat maturasi procaspase-3 yang berperan sebagai aktivator apoptosis.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini disimpulkan bahwa: (a) stres psikologis dan stress psikologis+fisik meningkatkan kadar kortikosteron, (b) peningkatan kadar kortikosteron meningkatkan ekspresi HSP-60 pada SPM-LP, (c) peningkatan kadar kortikosteron meningkatkan ekspresi HSP-90 pada SPM-LP, (d) peningkatan ekspresi HSP-60 mengakibatkan penurunan jumlah fibroblast.

REFERENSI

1. Putra H.T. 2011. Psikoneuroimunologi Kedokteran. Ed.2 Pusat Penerbitan dan Percetakan UNAIR, Surabaya. p. 1-239.
2. Asnar E. S.T.P. 2001. Peran perubahan limfosit penghasil sitokin dan peptide motilitas usus terhadap modulasi respons imun mucosal tikus yang stress akibat stressor renjatan listrik. *Disertasi*. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya. p. 91-182.
3. Poli P.S. 2010. Komunikasi sel dalam biologi molekular. Jalur sinyal dan Implikasi klinis. EGC. Jakarta. p. 5-264.
4. Karp G. 2010. *Cell Biology*. John Wiley & Sons (Asia) Pte Ltd. Singapore. p. 31-649.
5. Ohta S., Yamada S., Matuzaka K., Inoue T. 2008. The behavior of stem cells and progenitor cells in periodontal ligament during wound healing as observed using immunohistochemical methods. *J. Period Res.* **43**:595-603.
6. Hidaka T., Nagasawa T., Shirai K., Kado T., Furuichi Y. 2012. FGF-2 induces proliferation of human periodontal ligament cells and maintains differentiation potentials of STRO-1⁺/CD146⁺ periodontal ligament cells. [Archives of Oral Biology](#). **57**(Issue 6): 830–840.
7. Giordano G., Monaca G.L., Annibali S., Cicconetti A., Ottolenghi L. 2011. Stem cells from oral niches: a review. *Annal di Stomatologia* **II**(1-2):3-8.
8. Guyton & Hall. 2006. Textbook of Medical Physiology. 11th Ed., Elsevier Saunders, Philadelphia, Pennsylvania. p. 252-320.
10. Destila. 2012. Berapa lama Anda bekerja?. KPTU Fakultas Teknik UGM-Yogyakarta. Hal 1-2. <http://ecc.Ft.ugm.ac.id>
11. Akhter R., Hannan M.A., Okhubo R., Morita M. 2005. Relationship between stress factor and periodontal disease in a rural area population in Japan. *Eur J Med Res.* **10**:352-357.
12. Buduneli N. 2012. Pathogenesis and treatment of periodontitis. Intech online publish. 200 pgs.
13. Chandna S. and Bathia M. 2010. Stress and Periodontium: a review of concepts. *Journal of Oral Health and Community Dentistry.* **4**(spl)1:17-22.
14. Newman M.G., Takei H.H., Klokkevold P.R., Carranza F.A., 2006. Clinical periodontology. 10th Ed. Saunders Elsevier, China. p. 68-92.
15. Zhao Y., Li Q., Cheng B., Zhang M., Chen Y. 2012. Psychological stress delays periodontitis healing in rat: the involvement of basic fibroblast growth factor. *Mediators Inflamm* 2012:732902.
16. Schuermann, J.P. Jiang, J. Cuellar, J. Llorca, O. Wang, L. Gimenez, L.E. Jin, S. Taylor, A.B. Demeler, B. Morano, K.A. Hart, P.J. Valpuesta, J.M. Lafer, E.M. Sousa, R.; "Structure of the Hsp110:Hsc70 nucleotide exchange machine"; *Mol. Cell*; (2008) **31**:232-243
17. Zhang F.H.M, Chen Y., Li Q., and Wu A. 2011. Psychological Stress Induces Temporary Masticatory Muscle Mechanical Sensitivity in Rats. Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* **2011**:8 p. Article ID 720603. Doi:10.1155/2011/720603.
18. Maeda H., Fujii S., Tomokiyo, A., Wada N., Akamine, K. (2011). Periodontal tissue engineering: Defining the triad. *Oral Craniofac Tissue Eng.* **1**:289-299.

