

LAPORAN
PENELITIAN FUNDAMENTAL



**MINYAK IKAN LEMURU (*SARDINELLA LONGICEPS*) MEREGLASI
SURVIVAL OSTEOLAS DAN OSTEOKLAS, EKSPRESI INTEGRIN
 $\alpha_v\beta_3$ TULANG ALVEOLARIS SERTA STRUKTUR GIGI PADA TIKUS
YANG MENGALAMI INFEKSI PERIODONTAL SELAMA MASA
ODONTOGENESIS**

Penanggung Jawab Program:

Dr. drg. Didin Erma Indahyani, M.Kes
drg. Izzata Barid, M.Kes
drg. Ari Tri W. Handayani, M.Kes

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

NOVEMBER, 2010

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian :

Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) Meregulasi Survival Osteoblas dan Osteoklas, Ekspresi Integrin $\alpha\beta 3$ Tulang Alveolaris serta Struktur Gigi Pada Tikus Yang Mengalami Infeksi Periodontal selama Masa Odontogenesis

2. Ketua Peneliti :

- a. Nama Lengkap : Didin Erma Indahyani
- b. Jenis Kelamin : L/P
- c. NIP : 132 162 521
- d. Jabatan Struktural : Penata/IIIc
- e. Jabatan Fungsional : Lektor
- f. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Gigi
- g. Pusat Penelitian : Universitas Jember
- h. Alamat : Jl. Kalimantan 37 Jember
- i. Telpon/Faks : 0331-333536/0331-331991
- j. Alamat Rumah : Jl. Nusantara Blok GL/10 Jember
- h. Telpon/Faks/E-mail: 08155904300/0331-331991

3. Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun

4. Pembiayaan

- a. Jumlah yang diajukan ke Dikti : Rp. 72. 700.000,-
- b. Jumlah biaya tahun ke 1 (satu) : Rp. 37.500.000,-
- Biaya tahun ke 1 (satu) yang diajukan ke Dikti : Rp. 37.500.000,-
- Biaya tahun ke 2 (dua) yang diajukan ke Dikti : Rp. 35.200.000,-

Jember, 20 November 2010

Mengetahui,
Dekan FKG Univ. Jember,

Ketua Peneliti,

drg. Herniyati, M.Kes.
NIP. 195909061985032001

Dr.drg.Didin Erma Indahyani,M.Kes.
NIP. 196903031997022001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian

Dr. Ir. Cahyoadi Bowo
NIP. 196103161989021001

DAFTAR ISI

Halaman Judul	
Halaman Pengesahan	1
Daftar Isi	2
Abstrak	3
Pendahuluan	4
Tinjauan Pustaka	7
Tujuan dan Manfaat	16
Metode.....	17
Luaran Penelitian	23
Hasil dan Pembahasan	24
Kesimpulan dan Saran	33
Daftar Pustaka	35

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis bagaimana pengaruh minyak ikan lemuru pada survival osteoblas dan osteoklas, ekspresi integrin $\alpha\beta3$ dan pembentukan gigi khususnya struktur giginya apabila mengalami infeksi jaringan periodontal selama masa odontogenesis. 30 tikus Wistar jantan umur 5 hari, dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok I sebagai kontrol, tikus tidak di beri perlakuan, kelompok II tikus diinjeksi LPS untuk menyebabkan terjadinya infeksi periodontal, yang dilakukan di regio molar kiri rahang atas. Kelompok III di injeksi LPS seperti kelompok II dan di beri minyak ikan secara peroral dengan dosis 1ml/300-350BB/hari. Tikus di dekapitasi pada umur 13 hari dan 21 hari. Survival osteoblas dan osteoklas di amati pada jumlah dan tingkat apoptosisnya. Apaptosis di analisis menggunakan TUNEL. Analisis struktur gigi menggunakan HHI indeks. Ekspresi integrin $\alpha\beta3$ diamati dengan metode imunohistokimia (IHC). Selain dilakukan analisis tersebut juga dilakukan pengamatan pada matriks metalloproteinase -1 (MMP-1) untuk menganalisis terjadinya kerusakan kolagen pada tikus yang mengalami perlakuan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tikus yang mengalami infeksi periodontal secara signifikan terjadi peningkatan jumlah osteoklas dan peningkatan apoptosis osteoblas, yang disertai dengan peningkatan ekspresi MMP-1 maupun ekspresi integrin $\alpha\beta3$. Hal itu mengaibatkan pada kelompok ini di jumpai kejadian hipoplasia dan hipokalsifikasi yang mengenai hampir seluruh permukaan gigi (indeks 9 dan 8). Tikus yang di beri minyak ikan lemuru dan di induksi LPS, jumlah osteoblasnya lebih tinggi dibandingkan osteoklas, dan apoptosis osteoblas minimal, sedangkan osteoklas di jumpai sel-selnya mengalami apoptosis. Selain itu ekspresi ekspresi integrin $\alpha\beta3$ dan ekspresi MMP-1 juga rendah. Halini dikarenakan osteoklas yang jumlahnya menurun pada kelompok tersebut. Pada kelompok ini mempunyai indeks HHI lebih rendah, berkisar 5 dan 6, artinya gigi hanya mengalami hipoplasia ataupun hipokalsifikasi pada salah satu permukaan saja yang tidak lebih dari setengah permukaan. Selain itu ada beberapa tikus yang tidak mengalami hipoplasia atau hipokalsifikasi. Disimpulkan bahwa minyak ikan lemuru dapat membantu mencegah terjadinya kelainan pada struktur gigi yaitu hipoplasia ataupun hipokalsifikasi pada email.

Kata kunci : minyak ikan, Lipopolisakarida, Hipoplasia dan hipokalsifikasi, odontogenesis, apoptosis, MMP-1 dan ekspresi integrin $\alpha\beta3$.

PENDAHULUAN

Penyakit periodontal yang berlanjut akan menimbulkan destruksi tulang alveolaris. Apabila terjadi pada masa geligi pergantian, memudahkan infeksi menyebar 20-30% lebih cepat pada benih gigi permanen yang masih dalam tahap pertumbuhan dan perkembangan (McDonnell, dkk., 2004), akibatnya gigi permanen erupsi prematur (McNamara, dkk., 1999), mengalami hipoplasi dan hipomineralisasi email (Nicolau, dkk., 2003) yang memudahkan terjadinya karies (Wan, dkk., 2003).

Lipopolisakarida (LPS) dan produk bakteri lain merupakan pemicu utama terjadinya destruksi tulang pada penyakit periodontal (Stashenko, 2002) karena menstimulasi peningkatan pembentukan dan aktivitas osteoklas yang berfungsi pada destruksi tulang (Schawartz, dkk., 1997). Pada hewan coba induksi LPS pada rahang atas selama odontogenesis mengakibatkan terjadinya hipoplasi dan hipokalsifikasi dan erupsi prematur gigi pada tikus (Indahyani, dkk., 2007).

Penyembuhan destruksi tulang alveolaris oleh penyakit periodontal perlu dilakukan, supaya tidak mengganggu pertumbuhan, perkembangan benih gigi dan fungsinya. Strategi terapi pada penyakit tulang adalah menurunkan perkembangan progenitor dan rekrutmen osteoklas, memacu apoptosis osteoklas matur dan menekan terjadinya apoptosis pada osteoblas (Manologas, 2000). Integrin $\alpha\beta3$, merupakan protein transmembran, menyebabkan terjadinya proliferasi, diferensiasi dan apoptosis osteoklas (Faccio, dkk., 2003). Saat ini penghambatan integrin $\alpha\beta3$ menjadi target terapi penyakit tulang (Faccio, dkk., 2003).

Minyak ikan yang banyak mengandung EPA dan DHA berperan penting terhadap penurunan mediator inflamasi dan resorpsi tulang. Beberapa penelitian yang telah dilakukan membuktikan bahwa diet minyak ikan terbukti menurunkan jumlah dan aktivitas preosteoklas serta osteoklas pada tikus yang mengalami infeksi periodontal (Indahyani, dkk., 2002). Reinwald, dkk., (2004) menyatakan bahwa diet minyak ikan mampu memperbaiki komposisi tulang, meningkatkan *Bone mineral density* (BMD) tulang pinggul dan tulang belakang pada orang tua laki-laki dan perempuan yang berumur antara 45-90 tahun (Weiss, dkk., 2005). Minyak ikan

ternyata juga mampu meningkatkan ekspresi *bone sialoprotein* (BSP) yang berfungsi pada aktivitas osteoblas (Indahyani, dkk., 2007) dan menurunkan osteopontin yang berfungsi pada aktivitas osteoklas (Indahyani, 2008).

Minyak ikan lemuru, dihasilkan dari limbah pengalengan, penepungan dan pemindangan ikan. Di Muncar, Banyuwangi perhari jumlahnya 1,5 ton, menghasilkan 5% minyak ikan lemuru (Amri, 2006; Yunizal, dkk., 1996). Minyak ikan lemuru mengandung *n-3 polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yaitu *eicosapentaenoic acid* 13,70% (EPA) dan *docohexanoic acid* (DHA) 8,91% (Estiasih, 1996). Oleh karena kandungan EPA dan DHA minyak ikan lemuru yang tinggi, maka minyak ikan mempunyai potensi dalam meregulasi pembentukan dan aktivitas osteoblas maupun osteoklas. Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengungkap potensi minyak ikan lemuru dalam masalah remodeling tulang dan pembentukan gigi geligi khususnya pada survival osteoblas dan osteoklas, ekspresi integrin $\alpha\beta3$ tulang alveolaris serta hipoplasi dan hipokalsifikasi gigi perlu dilakukan.

Diet minyak ikan terbukti memperbaiki komposisi tulang, meningkatkan bone mineral density dan dapat menurunkan aktivitas osteoklas, yang berfungsi pada proses resorpsi tulang. Hal tersebut karena minyak ikan mengandung asam lemak tidak jenuh n-3 (n-3 PUFA) yaitu EPA dan DHA. n-3 PUFA terbukti menurunkan produksi sitokin proinflamatori yaitu interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) dan eikosanoid yaitu prostaglandin (PGE₂), yang berperan penting pada pembentukan dan peningkatan aktivitas osteoklas.

Pada proses pembentukan tulang tidak hanya dibutuhkan menurunnya resorpsi tulang saja, tetapi harus ada keseimbangan mineral dalam tulang, yang di timbulkan oleh osteoblas. Osteoblas mensekresi BSP yang berfungsi pada motilitas osteoblas ke daerah tulang yang mengalami mineralisasi. BSP mempunyai afinitas tinggi pada kalsium dan hidroksiapatit.

Sampai saat ini belum diketahui efek minyak ikan terhadap aksi osteoblas dan BSP yang berperan penting pada mineralisasi tulang. Minyak ikan lemuru mengandung 13,70% DHA dan 8,91% EPA, sehingga berpotensi terhadap modulasi mineralisasi tulang. Oleh karena potensinya tersebut penelitian pada EPA dan DHA

dari minyak ikan lemuru dalam mempengaruhi proliferasi osteoblas, sekresi BSP dan pembentukan mineralisasi jaringan perlu dilakukan.

TINJAUAN PUSTAKA

1. Sel-sel tulang

Tulang terdiri dari matriks organik yang termineralisasi dan sel tulang yaitu osteoblas, osteosit dan osteoklas. Osteoblas dan osteoklas diperoleh dari prekursor yang berasal dari sumsum tulang.

a. Osteoblas

Osteoblas berasal dari *local pluripotent mesenchymal stem cells*, yaitu dari sel stem stromal sumsum tulang (endogenous) atau sel-sel stem mesenkim jaringan ikat (periosteum). Prekursor tersebut akan distimulasi untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi preosteoblas, kemudian akan berdiferensiasi lagi menjadi osteoblas yang matur (Baron, 2006). Faktor yang mampu memulai osteoblastogenesis adalah *bone morphogenic proteins* (BMPs) (Rosen, dkk., 1996 sit Manolagas, 2000). BMPs akan menstimulasi transkripsi gen yang menyandi *osteoblast-specific transcription factor* disebut juga dengan *osteoblast specific factor 2* (Osf2) atau *core binding factor a 1* (Cbfa1) (Ducy, dkk., 1997). Cbfa1 akan mengaktifkan gen-gen spesifik dalam osteoblas yaitu OPN, BSP, kolagen tipe I dan osteocalcin (OC) (Gao, dkk., 1998). Faktor-faktor lain yang dapat, menstimulasi replikasi dan diferensiasi osteoblas yaitu *transforming growth factor β* (TGF β), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *insulin-like growth factors* (IGFs) dan kelompok-kelompok dari *fibroblast growth factor* (FGF) (Manolagas, 2000).

Selama perkembangan dan maturasi, osteoblas mengekspresikan gen-gen yang spesifik. Osteoblas tidak pernah nampak atau berfungsi secara individual, tetapi selalu dalam kelompok-kelompok sel kuboid di sepanjang permukaan tulang (100-400 sel/daerah pembentukan tulang). Osteoblas yang matur akan mensekresi osteoid, kolagen tipe I, faktor pertumbuhan, alkaline fosfatase. Proses pembentukan tulang terjadi melalui tiga proses yaitu produksi dan maturasi matriks osteoid yang kemudian dilanjutkan dengan mineralisasi (Baron, 2006).

Mineralisasi tulang terjadi dengan adanya deposisi kristal HA dalam matriks organik yang terdiri dari kolagen tipe I dan beberapa protein yang lain (Hunter, dkk.,

1994; Stevens dan Lowe, 1997). Deposisi HA terjadi apabila konsentrasi lokal Ca^{++} dan PO_4^{3-} di atas nilai ambang, yang prosesnya adalah sebagai berikut.

1. Glikoprotein dalam osteoid berikatan dengan Ca^{++} ekstraselular
2. Enzim alkalin fosfatase yang banyak terdapat dalam osteoblas, meningkatkan konsentrasi lokal Ca^{++} dan PO_4^{3-}
3. Vesikel matriks yang diproduksi osteoblas akan mengalami penumpukan Ca^{++} dan PO_4^{3-} , dan alkalin fosfatase serta pirofosfatase terus menerus memecah PO_4^{3-} dari molekul-molekul besar yang berasal dari cairan ekstraseluler.

(Stevens dan Lowe, 1997).

b. Osteoklas

Osteoklas berasal dari sel stem hematopoietik dalam sumsum tulang. Osteoklas dibentuk oleh fusi progenitor *mononuclear* dari monosit-makrofag *lineage*. Osteoblas dalam periosteum dan sel stromal yang menyerupai osteoblas (*osteoblast-like*) dalam jaringan hematopoietik mengontrol pembentukan dan aktivasi osteoklas melalui kontak sel ke sel dengan sel progenitor (Lerner, 2004). Diferensiasi prekursor osteoklas menjadi osteoklas multinuklear yang matur dan fungsi osteoklas diatur secara lokal yaitu sitokin dan secara sistemik yaitu hormonal (Zheng, dkk., 1991; Baron, 2006).

Osteoblas/sel stromal mengekspresikan *osteoclast differentiation factor* (ODF) atau *stromal osteoclast forming activity* (SOFA) dalam merespon $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), PTH dan IL-11. Prekursor osteoklas akan mengenali ODF/SOFA (*Receptor activator for NF- κ B ligand* (RANKL, disebut juga TRANCE, ODF dan OPGL) melalui RANK *receptor* (TRANCER) yang terletak dalam osteoklas yang kemudian akan berdiferensiasi menjadi osteoklas. Sel stromal maupun osteoblas juga akan menstimulasi *macrophag colony stimulating factors* (M-CSF yang juga dikenal sebagai CSF-1) dalam merespon $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dan IL. M-CSF, IL-1, RANKL akan menyebabkan prekursor osteoklas berdiferensiasi dan mengalami fusi kemudian aktif menjadi osteoklas multinuklear (Suda, dkk., 1999).

Osteoklas merupakan sel multinuklear dengan diameter besar yang mengandung 4-20 nukleus. Osteoklas ditemukan kontak dengan permukaan tulang dan dalam lakuna (*Howship's lacuna*). Pada daerah resorpsi dapat ditemukan osteoklas kurang lebih 4-5 osteoklas tetapi biasanya hanya 1 atau 2 osteoklas (Baron, 2006).

Dalam sitoplasma osteoklas, *carbonic anhidrase II* (CA II) membentuk asam karbonat (H_2CO_3) dari karbondioksida (CO_2) dan air. Asam karbonat terurai menjadi bikarbonat (HCO_3^-) dan proton (H^+). Proton digerakkan melalui *ruffled border* ke dalam lakuna dengan *vacuolar proton pump* (H^+ -ATPase). Membran *ruffled border* dipertahankan oleh *channel chlorid* yang berpasangan dengan H^+ -ATPase dan menghasilkan HCL yang mengakibatkan celah/rongga ekstraselular yang dekat dengan tulang mempunyai pH 4-5. Lingkungan yang asam menyebabkan degradasi HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) yang merupakan komponen mineral tulang. Proton mendegradasi HA menjadi Ca^{2+} yang larut dalam fosfat anorganik (HPO_4^{2-}) dan air. Selain itu osteoklas juga mensekresi *tartrate-resistant acid phosphatase* dan thiol proteinase yang merupakan *acidic collagenase*, *cathepsin K*, yang diperlukan untuk efisiensi degradasi tulang (Blair, dkk., 2002).

Penurunan resorpsi ditimbulkan oleh keseimbangan kalsium dan kandungan mineral tulang yang dilakukan oleh sel-sel tulang yaitu osteoblas dan osteoklas (Mühlbauer dan Fleisch, 1990). Ketidakseimbangan mineralisasi sering ditemukan karena adanya inflamasi, keganasan maupun proses degenerasi (Fohr, dkk., 2003). Pada proses regenerasi, tulang yang dihilangkan oleh osteoklas diganti oleh osteoblas. Pembentukan tulang oleh osteoblas merupakan proses yang lama dan berlangsung beberapa bulan. Peristiwa seluler yang terjadi pada pembentukan tulang merupakan peristiwa pergerakan prekursor osteoblas ke daerah resorpsi dengan proses kemotaksis, dan juga adanya proliferasi prekursor osteoblas yang diikuti oleh diferensiasi untuk menjadi sel yang matur. Osteoblas matur mampu mensintesis protein tulang yaitu kolagen type I, osteokalsin, osteopontin, alkalin fosfatase, proteoglikan dan komponen komponen faktor regulasi pertumbuhan yang disimpan dalam matriks tulang (Mundy, 1991).

2. Survival osteoblas dan osteoklas

Perubahan pada pembentukan tulang merupakan akibat dari rekrutment prekursor osteoblas yang berhubungan erat dengan terjadinya perubahan fungsi dan diferensiasi osteoblas. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa perubahan survival osteoblas ataupun osteosit berperan penting pada pengurangan pembentukan tulang. Survival osteoblas merupakan bagian penting yang tergantung dengan adanya perlekatan sel yang dimediasi oleh integrin matriks ekstraselular. Penurunan ekspresi mRNA $\alpha\beta3$ di dalam sel osteoprogenitor menghasilkan perubahan aktivasi signaling IGF-1 dan proliferasi osteoblas (Sakata, dkk., 2009)..

Apoptosis merupakan komponen penting yang terlibat dalam osteogenesis secara normal dan patologis. Abnormalitas patologis pada kematian sel bisa disebabkan dari perubahan target yang beragam. Di dalam sel mamalia, proses apoptosis melalui beberapa tahap yang melibatkan pada induksi fase upstream dan downstream. Peristiwa upstream melibatkan induksi signal transduction cascades dan aktivasi molekul intraselular. Peristiwa downstream, melibatkan pelepasan protein dari mitokondria dan aktivasi protease dan nuklease yang berperan pada degradasi DNA, dan terutama kematian sel (Schwartzman dan Cidlowski, 1993).

Lipopolikarida menginduksi osteoblast untuk mengekspresikan NOD1 and NOD2, yaitu dua kelompok *nucleotide-binding domain* dan *leucine-rich repeat region* yang mengandung kelompok protein reseptor biasa disebut NLRs, yang bertindak sebagai sensor intraselular untuk bakteri peptidoglikan dan menginisiasi produksi mediator proinflamatori. *NLR family CARD domain* yang terdiri dari 4 (NLRC4, yang saat ini dikenal sebagai Ipaf, Card12, atau CLAN) dan *NLR family pyrin domain* yang terdiri dari 3 (NLRP3, yaitu dikenal sebagai CIAS1, cryopyrin, PYPAF1, atau NALP3) telah diimplikasikan dalam menginduksi kematian sel dalam merespon bakteri dan komponennya (Gumucio, dkk., 2002; Sutterwala, dkk., 2006). Kedua molekul tersebut dapat berhubungan dengan protein adaptor yaitu *apoptosis-associated speck-like protein (ASC)* untuk menstimulasi aktivasi caspase-1 and caspase-8 yaitu enzim yang menunjukkan peningkatan aktivitas osteoblas setelah terinduksi bakteri. Aktivasi caspase-1 dan caspase 8 menginduksi apoptosis osteoblas (Mariathan, dkk., 2007; McCall, dkk., 2008).

Apoptosis osteoblas juga diakibatkan meningkatnya produksi Nitric oxide (NO) akibat induksi lipopolisakarida. Lipopolisakarida dan sitokin proinflamatori, terbukti menstimulasi peningkatan iNOS. Kuzushima, dkk., (2006), menyatakan bahwa Tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and interferon- γ menyebabkan kematian sel osteoblas yang di mediai oleh apoptosis bukan nekrosis. Sitokin terbukti menghasilkan peningkatan Inducible nitric-oxide synthase (iNOS) mRNA dan nitric-oxide (NO) dalam sel. NO menginduksi apoptosis osteoblas melalui synthesis Bax protein (Mungrue, dkk., 2003). Selain itu NO menyebabkan penekanan pada viabilitas sel, potensial membran mitokondria dan sintesis ATP, yang mengakibatkan gangguan pada fungsi mitokondria, reaksi spesies oksigen intraseluler dan protein Bcl-2 yang berperan penting pada apoptosis osteoblas (Ruei-Ming Chen, 2006).

3. Lesi periapikal

Infeksi pulpa gigi terjadi sebagai akibat adanya karies, prosedur operatif gigi dan trauma yang melibatkan bakteri anaerobik Gram negatif dalam rongga mulut. Infeksi tersebut meningkatkan respons imun pulpa gigi, tetapi sering tidak efektif dalam mengeliminasi invasi bakteri, akibatnya terjadi nekrosis pulpa totalis yang selanjutnya akan menstimulasi respons imun sekunder di regio periapikalis. Respons imun periapikalis dikenal sebagai periodontitis apikalis. Salah satu akibat terjadinya respons imun yang kurang baik adalah adanya kerusakan tulang (Stashenko, 2002). Miyauchi (1992) menyatakan bahwa inflamasi pulpa bagian atas terjadi 3 hari setelah pembukaan ruang pulpa dan akan meluas ke daerah apikal dalam waktu 2 minggu setelahnya. Selanjutnya terjadi abses dan resorpsi tulang di regio periapikalis. Keluhan penderita adalah tidak mampu mengunyah pada sisi tersebut, sangat sakit dan terjadi mobilitas gigi (Gonzalez-Moles dan Gonzalez, 2004). Penelitian Anan, dkk. (1993) menunjukkan 2-3 hari setelah pembukaan pulpa pada gigi tikus terlihat peningkatan aktivitas *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP) di daerah tulang periapikalis, yang merupakan petanda aktivitas osteoklas. Komponen bakteri yang terlibat yaitu LPS, menginduksi beberapa mediator polipeptida dan sitokin proinflamatori (Stashenko, 1990). LPS *A. actinomycetemcomitans* menyebabkan resorpsi tulang karena adanya peningkatan prostaglandin E-2 (PGE₂) dan IL-1

(Ishihara, dkk., 1991). Kultur sel prekursor osteoklas yang diinduksi dengan LPS *E. coli* menyebabkan pembentukan osteoklas (Jiang, dkk., 2003). Empat kali injeksi LPS *E. coli* setiap 48 jam pada mukosa alveolaris di daerah labial menyebabkan adanya inflamasi dan peningkatan jumlah osteoklas. Inflamasi tersebut berubah menjadi inflamasi kronik setelah 8 kali injeksi. Pada inflamasi kronik ini terjadi peningkatan ukuran dan jumlah intisel osteoklas. Penambahan dosis LPS yang dimulai dari 5µg, 50 µg dan 500 µg menyebabkan peningkatan jumlah dan aktivitas osteoklas (Umezu, dkk., 1989).

4. Lipopolisakarida (LPS)

LPS adalah molekul besar yang mengandung lemak dan karbohidrat, merupakan struktur utama dinding sel bakteri Gram negatif yang berfungsi untuk integritas struktur bakteri dan melindungi bakteri dari sistem pertahanan imun *host*. LPS terdiri dari 3 bagian yaitu rantai O-polisakarida, inti polisakarida dan *lipid A*. Rantai O-polisakarida dikenal sebagai O-antigen bakteri yang meluas dari inti polisakarida, yang mudah dikenali oleh antibodi *host*. Inti polisakarida dilekati oleh lipid A, merupakan bagian yang bertanggung jawab untuk toksisitas bakteri Gram negatif. LPS bersifat endotoksin karena LPS mengikat reseptor CD14 (Janeway, dkk., 2001). CD14 merupakan reseptor permukaan sel pada makrofag dan monosit untuk karbohidrat (Akashi, dkk., 2000; Ziegle-Heitbrock dan Ulevith, 1993). *Toll-like receptor-4* (TLR4) makrofag dan monosit yang berikatan dengan bakteri oleh karena adanya CD14 akan menginduksi sekresi sitokin dan *mediator lipid inflammation* (Janeway, dkk., 2001)

P. gingivalis, *A. actinomycetemcomitans* dan *bacteroides Sp* terdeteksi pada gingivitis marginalis maupun infeksi periapikalis (Imai, dkk., 2005; Geibel, dkk., 2005). Bakteri-bakteri lain yang juga terdeteksi pada lesi periapikal adalah *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *F. nucleatum* atau *S. sanguinis* (Geibel, dkk., 2005). LPS bakteri Gram negatif yaitu *A. actinomycetemcomitans* mempunyai struktur O-antigen yang sama dengan LPS *E. Coli* (Lakio, dkk., 2003). *A. actinomycetemcomitans* dan *E. coli* mempunyai potensi patogenesis yang identik oleh karena *outer membrane protein* (OMP) *A. actinomycetemcomitans* dan *E. coli*

mengandung protein yang mampu mengikat bagian Fc imunoglobulin. Hal tersebut merupakan salah satu faktor mekanisme virulensi bakteri (White, dkk., 1998). Lipopolisakarida A. *Actinomycetemcomitans* dan *E. coli* mampu menginduksi sitokin proinflamatori IL-1 β , IL-6, IL-8 dan TNF- α dari fibroblas gingiva (Agarwal, dkk., 1995). Penelitian Yoshimura, dkk. (1997) menunjukkan bahwa LPS A. *actinomycetemcomitans* dan *E. coli* mampu menginduksi PMN untuk mensekresi IL-1 β , IL-8, TNF- α dan *interleukin receptor antagonis* (IL-1ra) dalam jumlah yang besar, sedangkan PMN yang diinduksi dengan LPS *P. gingivalis*, IL-1 β tidak terdeteksi. Monosit yang diinduksi dengan LPS *P. gingivalis* dan *E. coli* mensekresi IL-1 β lebih tinggi daripada PMN.

Deteksi secara imunohistokimia pada infeksi pulpa dan lesi periapikal, terdapat ekspresi IL-1 α , IL-1 β dan TNF- α , ekspresi tersebut meningkat pada hari ke 4 setelah pulpa terbuka dan mencapai puncaknya pada hari ke 14 setelah terdapat lesi periapikal (Tani-Ishii, dkk., 1995). Dengan *polymerase chain reaction* (PCR), ekstrak gen-gen yang diperoleh dari lesi periapikal, menunjukkan ekspresi yang tinggi (Wang, dkk., 1997). Interleukin-1 dan TNF- α merupakan elemen kunci sitokin proinflamatori yang diaktifkan dalam merespons infeksi. Interleukin-1 sendiri lebih berpotensi dari pada TNF, tetapi keduanya menstimulasi resorpsi tulang (Wang dan Stashenko, 1993).

Prostaglandin meningkat pada lesi pulpa dan periapikal manusia (Cohen, dkk., 1985). Hal ini sesuai dengan penelitian Takayama, dkk. (1996), bahwa konsentrasi PGE₂ terlihat tinggi pada eksudat lesi periapikal yang ditentukan dengan *radioimmunoassay*. Tingginya PGE₂ dihubungkan dengan adanya gejala klinis yang direfleksikan pada lesi periapikal yang akut, dan destruksi jaringan yang ditunjukkan dengan meningkatnya ukuran daerah radiolusen. Hal ini oleh karena keberadaan dan aksi PGE₂ dikaitkan dengan inflamasi dan terjadinya destruksi periapikal seperti vasodilatasi, peningkatan permeabilitas vaskular, degradasi kolagen dan resorpsi tulang (Offenbacher, dkk., 1993).

5. Minyak ikan

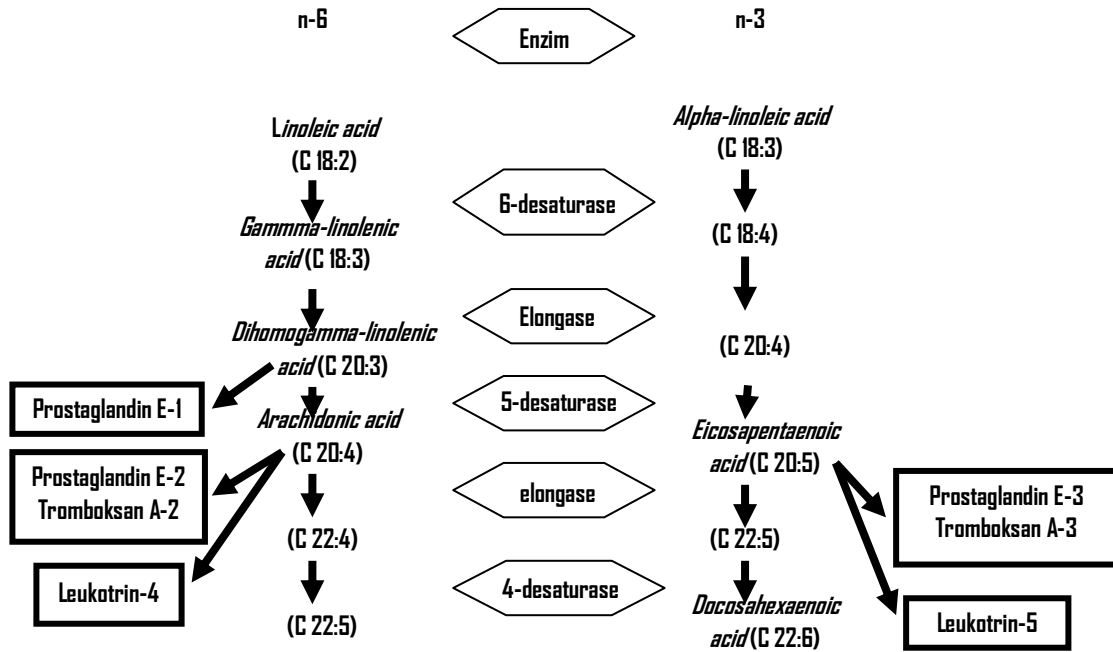
a. Metabolisme minyak ikan

Minyak ikan merupakan lemak ikan yang berbentuk cair. Minyak tersebut diisolasi dari ikan yang hidup pada tumbuhan di bawah permukaan laut, misalnya ikan cod, hiu dan hering (Peck, 1994a; Winarno, 1997). Minyak ikan mempunyai bau dan rasa agak amis, tetapi tidak berbau tengik, sedikit larut dalam alkohol tetapi dengan bebas larut dalam eter, kloroform, karbon disulfat dan etil asetat (Tyler, dkk., 1981). Asam lemak tidak jenuh disebut juga *polyunsaturated fatty acid* (PUFA), dibagi menjadi dua keluarga besar yaitu n-6 PUFA dan n-3 PUFA, yang keduanya mempunyai fungsi fisiologis berbeda (Winarno, 1997). n-6 PUFA banyak ditemukan terutama pada minyak nabati sedang n-3 PUFA banyak ditemukan terutama dalam minyak ikan. *Eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA) hanya ditemukan pada minyak ikan (Newton, 1996), kandungannya sebesar $\pm 25\%$ - 35% (Galli sit Raz, dkk., 1997). Satu gram minyak ikan mengandung ± 180 mg EPA dan 120 mg DHA (Kelley, 1996). Minyak ikan dari ikan menhaden mempunyai kandungan EPA dan DHA lebih tinggi dari pada minyak yang lain.

n-6 PUFA (*linolenic acid*) diubah menjadi rantai panjang melalui proses desaturasi dan elongasi menjadi γ -asam linolenat (GLA) dan asam arakhidonat (AA) sedang n-3 *fatty acid* α *linolenic acid* diubah menjadi EPA dan DHA. Proses metabolisme minyak ikan yang potensial adalah :

1. EPA mengganti sebagian asam arakhidonat (AA) dalam jaringan atau kumpulan prekursor eikosanoid (prostaglandin (PGE₂), tromboksan (TXA₂), leukotrin (LTB, LTC), dengan demikian mengurangi persediaan AA untuk mensintesis eikosanoid.
2. EPA sebagai antagonis menggantikan peranan AA untuk oksigenase dengan enzim yang mensintesis eikosanoid (siklooksigenase dan lipoksigenase).
3. Eikosanoid yang disintesis dari EPA (contoh PGE₃, TXA₃, LTB₅ atau LTC₅) mengurangi sifat inflamasi (Galli, dkk., sit Raz, dkk., 1997; Calder, 1998).

Gambaran metabolisme n-3 dan n-6PUFA dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Mekanisme metabolisme n-3 dan n-6 PUFA
Sumber: Newton (1996)

n-3 PUFA dikatakan mempunyai efek anti inflamasi karena kemampuannya merubah komposisi membran fosfolipid yang mengakibatkan terjadinya perubahan fluiditas membran, ikatan sitokin dan reseptornya, aktivitas protein (Grimble dan Tappia, 1998), serta berintegrasi langsung dengan aktivitas seluler (Peck,1994b). Fluiditas membran mempunyai pengaruh kuat pada fungsi membran yang penting, seperti pembentukan dan aktivitas membran yang dihubungkan dengan enzim dan reseptor *second messenger system* dan signaling sel (Wiseman, 1996).

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

1. TUJUAN

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk menganalisis pengaruh minyak ikan lemuru pada proses remodeling tulang terhadap tikus yang mengalami infeksi periodontal selama masa odontogenesis.

Tujuan khusus penelitian ini adalah

Tahun I:

1. Struktur gigi yaitu terjadinya kelainan hipoplasi dan hipokalsifikasi email
2. Survival osteoblas dan osteoklas, dengan mengetahui tingkat apoptosisnya

Tahun II:

1. Ekspresi integrin $\alpha\beta3$ tulang alveolaris

2. MANFAAT PENELITIAN

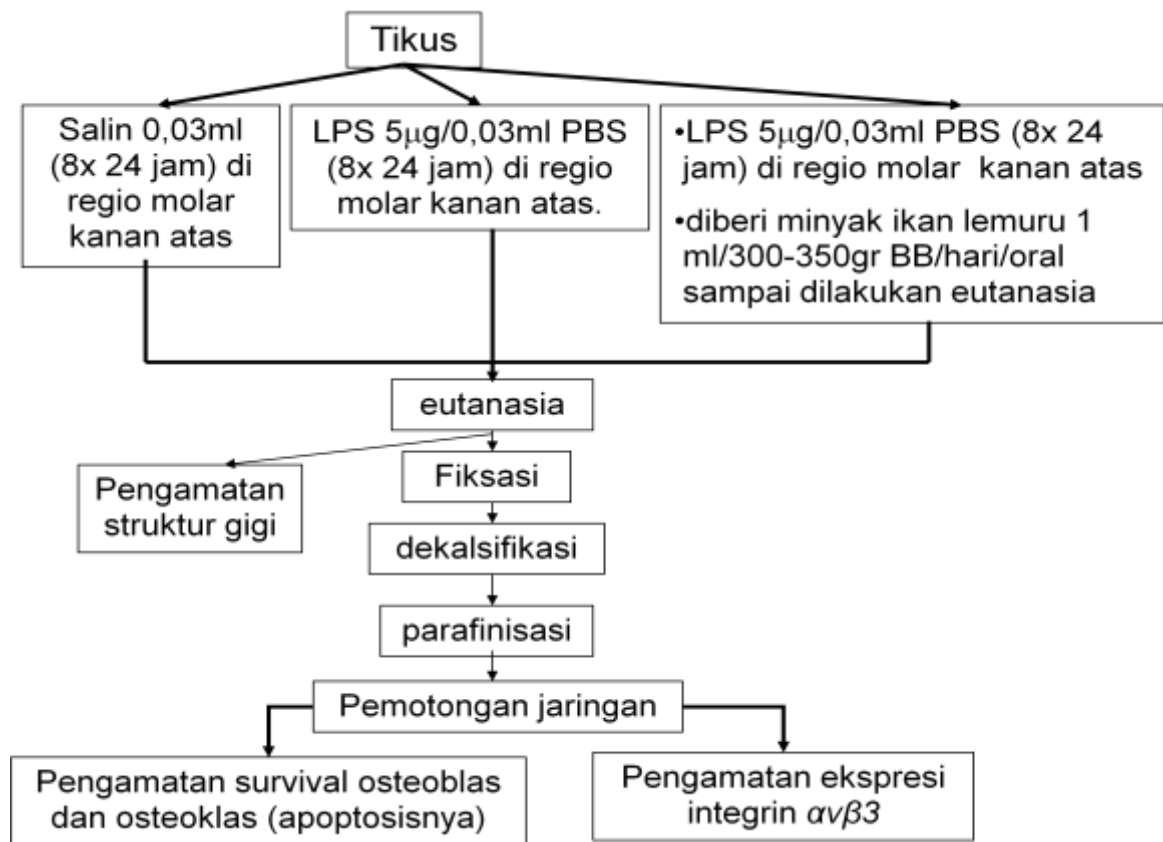
- Memberi landasan yang kuat dan rasional pada penggunaan minyak ikan lemuru sebagai bahan untuk remodeling tulang alveolaris ataupun tulang di bagian tubuh lain, baik normal maupun patologis.
- Penelitian tentang minyak ikan lemuru ini penting artinya, karena dapat memberikan alternatif terapi dengan biaya yang jauh lebih murah dan mudah didapat.
- Memberikan manfaat yang maksimal dalam pemanfaatan sumberdaya alam kelautan untuk kemajuan ilmu pengetahuan pengobatan dan kesehatan.

METODE PENELITIAN

1. Jenis Penelitian : eksperimental laboratoris murni
2. Variabel bebas : Minyak ikan lemuru
3. Variabel terikat :
 - Survival osteoblas dan osteoklas
 - Integrin $\alpha\beta3$
 - Struktur gigi (enamel hipoplasi dan hipokalsifikasi)
4. Variabel terkontrol :
 - Jenis kelamin tikus : jantan
 - Umur tikus : 5 hari
 - Galur tikus : Wistar
 - Makanan standart induk tikus : AIN 93
 - Jenis LPS : LPS Pg (Sigma)
 - Minyak ikan lemuru : diperoleh dari minyak ikan limbah lemuru secara tradisional dari Muncar, Banyuwangi
5. Bahan dan alat penelitian
 - a. Bahan : LPS *phorphyromonas gingivalis* (Pg), DHA dan EPA, fosfat buffer salin (PBS), *Transferase-mediated digoxigenin-deoxy-UTP nick end labeling* *Mouse monoclonal antibody against rat integrin $\alpha\beta3$* , *Bovine Serum Albumin* (BSA), *substrat buffer* pH 9,8, *substrat (4-nitrophenyl phosphate)* Bouin's fixative, asam asetat/formal salin, blok parafin, etanol, , amino-hexanoyl biotin dan streptavidine, metil green, *biotinylated anti mouse IgG* (skunder antibodi untuk IHC), *Avidin-biotin peroxidase*, *3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB), *counter stain Mayer's Hematoxylin*
 - b. Alat : mikropipet, sonde lambung, syring unit, autoklaf, mikrotom, mikroskop cahaya, oven, mikroskop
6. Definis Operasional:

- a. Minyak ikan , merupakan lemak yang berbentuk cair, berasal dari limbah ikan lemuru (*S. longiceps*), yang diolah secara tradisional oleh para nelayan di daerah Muncar Banyuwangi.
- b. Survival osteoklas dan osteoblas adalah dengan membedakan terjadinya apoptosis pada sel osteoblas maupun osteoklas yang dilakukan dengan melakukan mengamatan menggunakan *DNA nick end labeling of bone sections*, nukleus sel akan tampak gelap
- c. Integrin $\alpha\beta3$ merupakan sel yang transmembran yang mempunyai fungsi untuk perlekatan osteoklas, apabila dilakukan pewarnaan dengan kromogen DAB akan nampak berwarna coklat.
- d. Struktur gigi pada penelitian ini meliputi gangguan srtruktur pada enamel gigi berupa enamel hipoplasi dan hipokalsifikasi. Hipoplasi adalah defisiensi ketebalan email yang terlihat seperti sumur-sumur kecil di email dan terkadang gigi akan nampak kuning, karena email yang tipis. Hipokalsifikasi adalah gangguan mineralisasi pada email yang terlihat adanya bintik putih yang terbatas jelas pada email.

7. Bagan Penelitian



Gambar 2. Bagan penelitian

8. Cara Penelitian

Tahun I : Pengujian pemberian minyak ikan lemuru terhadap survival osteoblas dan osteoklas serta pengamatan struktur gigi

A. Persiapan subyek penelitian

Tiga puluh ekor tikus Wistar, jantan, umur 5 hari, dibagi menjadi 3 kelompok yaitu :

- a. Kelompok I tikus diinduksi dengan salin normal
- b. Kelompok II tikus diinduksi dengan LPS
- c. Kelompok III tikus diinduksi dengan minyak ikan dan LPS

Masing-masing kelompok dibagi menjadi 2 sub kelompok yaitu kelompok yang akan didekapitasi pada umur 13 hari dan umur 21 hari.

Minyak ikan lemuru diberikan dengan dosis 1ml/300-350 gram berat badan tikus, secara peroral, menggunakan sonde lambung, dan diberikan tiap hari sampai

tikus dilakukan dekapitasi. Lipopolisakarida (LPS) diinduksikan dengan tujuan untuk menyebabkan infeksi periodontal. Induksi LPS dilakukan di bukal fold regio molar rahang atas, dengan dosis 5µl LPS/0,03PBS yang dilakukan 24 jam sekali sebanyak 8 kali (Indahyani, 2007a). Tikus didekapitasi bila telah berumur 13 dan 21 hari. Tikus yang telah didekapitasi diambil rahang atas kanannya.

B. Kelainan struktur gigi yang telah erupsi diamati adanya hipoplasi ataupun hipokalsifikasi email giginya, berdasarkan indeks hipoplasi dan hipokalsifikasi email sebagai berikut.

1. 0 = tidak ada hipoplasi atau hipokalsifikasi
2. 1 = hipokalsifikasi terjadi pada setengah insisal atau oklusal mahkota gigi
3. 2 = hipokalsifikasi terjadi pada setengah servikal mahkota gigi
4. 3 = hipoplasi terjadi pada setengah insisal atau oklusal mahkota gigi
5. 4 = hipoplasi terjadi pada setengah servikal mahkota gigi
6. 5 = hipokalsifikasi < setengah permukaan fasial mahkota gigi
7. 6 = hipokalsifikasi > setengah permukaan fasial mahkota gigi atau yang terlibat lebih dari satu permukaan gigi
8. 7 = hipoplasi < setengah permukaan fasial mahkota gigi
9. 8 = hipoplasi > dari setengah permukaan fasial mahkota gigi atau yang terlibat lebih dari satu permukaan gigi
10. 9 = hipokalsifikasi/hipoplasi tidak termasuk diatas (hipoplasi yang *diffuse*, dan terbatas pada satu permukaan selain fasial.

(Hargreaves, dkk., 1989)

C. Pengamatan apoptosis osteoblas dan osteoklas dengan *DNA nick end labeling of bone sections*

- a. Rahang atas kanan dibagi menjadi 2. Bagian pertama difiksasi, bagian yang lain difiksasi dengan Bouin's fixative 4°C semalam, spesimen didemineralisasi menggunakan asam asetat/formal salin dan ditanam dalam blok parafin (disimpan)
- b. Potongan yang tanpa didekalsifikasi ditanam dalam metil metakrilat

- c. Dipotong dan irisan diletakkan di atas *slide* yang dilapisi *silane*
- d. *Slide* kemudian diletakkan dalam pepsin 0,5% dalam 0,1 N HCL selama 20 menit suhu 37C.
- e. Fragmentasi DNA dideteksi dengan *TUNEL reaction (Transferase-mediated digoxigenin-deoxy-UTP nick end labeling)*.
- f. Irisan dikonterstain dengan 3% *metil green*.
- g. Irisan diinkubasi selama 1-2 menit dengan 0,15% CuSO₄ dalam 0,9% NaCl.
- h. *TUNEL reactions* nampak pada nukleus sel dan sel yang nukleusnya nampak coklat gelap yang jelas adalah positif. *TUNEL rections* yang positif adalah sel yang mengalami proses apoptosis (Weinstein, dkk., 1998).

Tahun II

A. Pengamatan ekspresi integrin $\alpha\beta3$ secara imunohistokimia

1. spesimen yang telah ditanam dalam blok parafin (pada tahun I),dipotong secara seri setebal 6 μ m, diletakkan di atas slide yang di lapisi dengan TES (3-aminopropyltriethoxysilane).
2. Spesimen didemineralisasi menggunakan asam asetat/formal salin (AFS: 4% formaldehyde dalam 10% asam asetat dan 0,85% sodium klorida (NaCl)).
3. Spesimen yang sudah didemineralisasi ditanam dalam blok parafin dan dipotong secara seri setebal 6 μ m dalam arah bukolingual dan diletakkan pada *slide* yang dilapisi dengan TES (3-aminopropyltriethoxysilane).
4. Deparafinisasi, dengan mencelupkan *slide* yang berisi irisan jaringan dalam xilol 1, xilol 2, xilol 3, alkohol absolut 3, alkohol absolut 2, alkohol absolut 1, alkohol 90%, alkohol 80%, alkohol 70%, masing-masing 2 menit.
5. *Slide* dimasukkan dalam 0,3% H₂O₂ dalam metanol 100ml, 10 menit
6. Cuci dalam air mengalir 10-15 menit, air distilasi, dikocok-kocok, PBS 3x masing-masing 5 menit
7. Teteskan *non immune serum* 1: 50 pada *slide*, inkubasi selama 30 menit.
8. Cuci dengan PBS 3x, masing-masing 5 menit

9. Teteskan antibodi primer (*Mouse monoclonal antibody against rat integrin $\alpha\beta3$*) yang telah diencerkan dengan *diluent buffer* dengan pengenceran 1:500, pada masing-masing *slide*, (untuk kontrol negatif diteteskan hanya dengan *diluent buffer*). Letakkan pada tempat yang lembab dan inkubasi semalam pada suhu 4°C
10. Cuci dengan PBS 3x, masing-masing 5 menit
11. Teteskan antibodi skunder (*biotinylated anti mouse IgG*) yang telah diencerkan dengan *diluent buffer* 1:200, inkubasi selama 30 menit
12. Cuci dengan PBS 3x, masing-masing 5 menit
13. Teteskan avidin-biotin, yang telah diencerkan dengan *diluent buffer* 1:100, inkubasi selama 30 menit
14. Cuci dengan PBS 3x, masing-masing 5 menit
15. Teteskan 3,3'-*diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB) atau 3-amino-9-*ethylcarbazole* (AEC), inkubasi 10-20 menit, observasi di bawah mikroskop sampai muncul warna coklat untuk kromogen DAB dan merah untuk kromogen AEC. Untuk kontrol negatif tidak menunjukkan perubahan warna.
16. Cuci dengan PBS 3x, masing-masing 10 menit, kemudian cuci dalam air mengalir 10-15 menit
17. *Counterstain* dengan *Mayer's Hematoxylin* 5 detik
18. Cuci dalam air mengalir 10 – 15 menit
19. Rehidrasi dengan alkohol 70%, 80%, 90%, absolut 1, absolut 2, absolut 3, xilol 1, xilol 2 dan xilol 3.
20. Bersihkan dengan tisu, dan tutup *cover slip*.
21. *Slide* diamati di bawah mikroskop cahaya (Syigeyama, dkk., 1996).

LUARAN PENELITIAN

1. Data untuk penulisan buku pengaruh minyak ikan lemuru terhadap ekspresi integrin $\alpha\beta3$ dan siap ISBN
2. Publikasi 1 jurnal nasional terakreditasi dan 1 jurnal internasional (di Journal of Nutrition atau Journal of Dental Research)
3. Menghasilkan 2 skripsi mahasiswa

HASIL DAN PEMBAHASAN

Integrin merupakan molekul interface di antara bahan-bahan intraselular dan ekstraselular, yang mempunyai peranan penting dalam signal transduksi dan regulasi gen yang mempengaruhi beberapa fungsi sel (Lim, dkk., tth). Ada beberapa integrin heterodimer misalnya $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha\nu\beta_1$ dan $\alpha\nu\beta_3$. Integrin tersebut berikatan dengan beberapa protein matriks ekstra selular (EMC) tulang termasuk kolagen tipe I, osteopontin, vitronektin, fibronektin dan bone sialoprotein. Ikatan tersebut tergantung pada interaksi spesifik antara reseptor integrin dan sequen pengenalan integrin Arg-Gly-Asp (RGD) dalam ECM untuk mengadakan adesi, pertumbuhan, diferensiasi dan mekanotransduksi sel tulang (Cheng, dkk., 2001; Grzesik dan Robey, 1994). Integrin $\alpha\nu\beta_3$ dinyatakan sebagai reseptor membrane untuk osteoadherin yaitu leucin kecil yang kaya proteoglikan dan disintesis oleh bovine osteoblas (Wendel *et al.*, 1998). Osteoadherin diekspresikan oleh osteoblas, odontoblas dan ameloblas (Buchaille *et al.*, 2000). Osteoadherin terletak di ekstraselular tulang alveolaris, predentin dan matriks enamel (Couple *et al.*, 2004). Selain itu osteoklas juga menunjukkan ekspresi yang sangat tinggi pada integrin $\alpha\nu\beta_3$, yang kemudian berikatan dengan beberapa protein yang mengandung RGD termasuk vitronectin, osteopontin and bone sialoprotein (Biosci, 1998) Over ekspresi integrin $\alpha\nu\beta_3$ menunjukkan terjadinya peningkatan proliferasi osteoblas, tetapi menghambat diferensiasi osteoblas, meningkatkan ekspresi osteopontin, tetapi menurunkan bone sialoprotein. Integrin $\alpha\nu\beta_3$ ternyata juga menunjukkan penurunan pembentukan kolagen tipe I (Cheng, 2001).

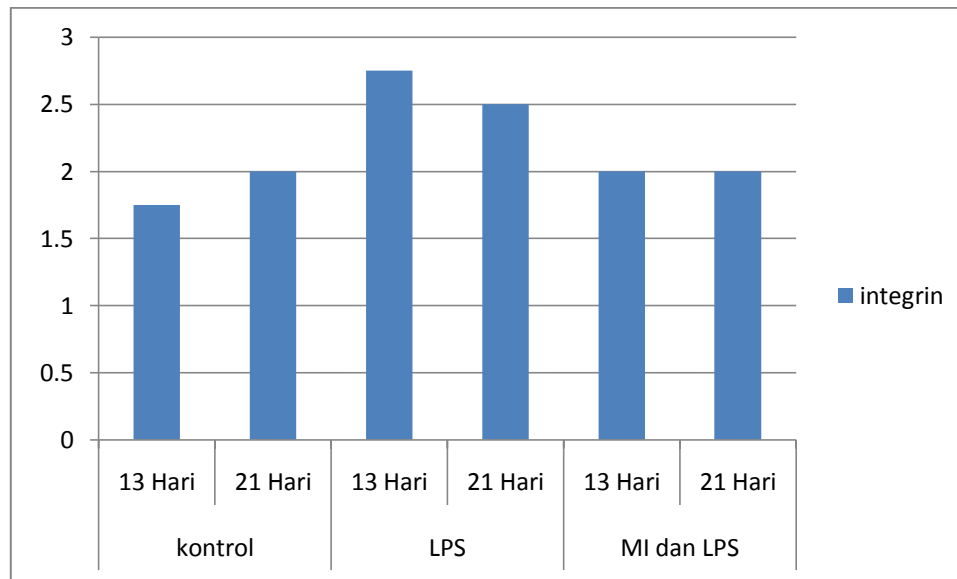
Minyak ikan lemuru, diketahui banyak mengandung EPA dan DHA yang tinggi, apabila pengolahan dilakukan dengan benar. EPA dan DHA juga telah diketahui dapat menghambat pembentukan osteoklas, meningkatkan apoptosis osteoklas. Oleh karena itu minyak ikan yang banyak mengandung EPA dan DHA menyebabkan penurunan jumlah dan aktivitas osteoklas. Pembentukan osteoklas dan

aktivitas osteoklas dipengaruhi berbagai factor yang sangat kompleks. Salah satunya adalah integrin $\alpha\beta_3$. Beberapa penelitian menyatakan bahwa integrin $\alpha\beta_3$ menjadi target terapi pada penyakit yang melibatkan resorpsi tulang. Oleh karena itu pada penelitian lanjutan ini, dilakukan analisis tentang pengaruh minyak ikan lemuru terhadap ekspresi integrin $\alpha\beta_3$. Adapun hasil penelitian adalah sebagai berikut;

Tabel 1. Ekspresi integrin $\alpha\beta_3$ pada tikus yang di beri minyak ikan lemuru

No.	Pengelompokan Sampel		UI	UII	UIII	UIV	Rerata
1	Kontrol	13 Hari	2	2	2	1	1.75
		21 Hari	2	2	2	-	2
2	Diinduksi LPS	13 Hari	3	2	3	3	2.75
		21 Hari	3	3	2	2	2.5
3	Diinduksi LPS dan Minyak Ikan	13 Hari	2	2	2	-	2
		21 Hari	3	1	2	2	2

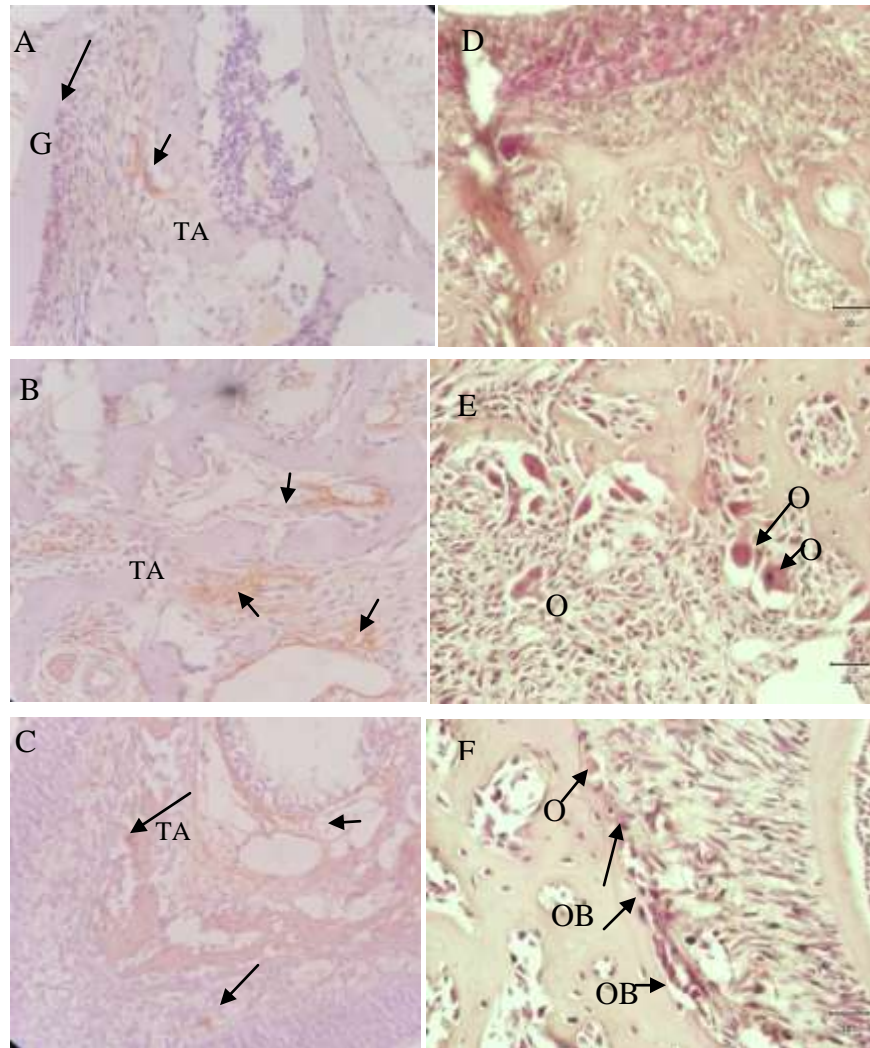
Pada tikus yang di induksi LPS menunjukkan tingginya ekspresi integrin $\alpha\beta_3$ bila dibandingkan dengan kelompok yang lain. Tingginya ekspresi tersebut dikaitkan dengan peningkatan osteoklas pada kelompok tersebut. Integrin $\alpha\beta_3$ diekspresikan cukup tinggi oleh osteoklas, walaupun sel-sel yang lain juga mengekspresikannya, misalnya osteoblas, odontoblas, dll. Dengan adanya integrin $\alpha\beta_3$ osteoklas akan mampu melakukan proliferasi, diferensiasi dan juga motilitas kearah daerah erupsi. Pada osteoblas, integrin $\alpha\beta_3$ mampu menyebabkan proliferasi tanpa bias mnegalami diferensiasi. Oleh karena itu, mengapa pada kelompok LPS, tingginya integrin $\alpha\beta_3$ disertai dengan tingginya osteoklas dari pada osteoblast (data penelitian tahun I). untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Ekspresi integrin $\alpha\beta_3$

Tikus yang di beri minyak ikan mempunyai integrin yang lebih rendah dari minyak ikan yang hanya di induksi LPS. Akan tetapi masih lebih tinggi dari pada kelompok kontrol. Minyak ikan yang mengandung EPA dan DHA, di kaitkan dengan penyebab perbedaan ini. Minyak ikan telah diketahui mampu menurunkan ekspresi sitokin proinflamatori yaitu IL-1 dan TNF-alpha, merupakan stimulator pembentukan osteoklas (osteogenesis) dan menghambat pertumbuhan osteoblas. Rendahnya ekspresi integrin $\alpha\beta_3$ oleh karena osteoklas yang mensekresinya dalam jumlah tinggi jumlahnya menurun. Hal ini sesuai dengan pernyataan Tandon, dkk., (2005), yaitu integrin $\alpha\beta_3$ di sekresi oleh osteoblas dan makrofag yang aktif. Menurunnya integrin $\alpha\beta_3$ tersebut juga menyebabkan osteoklas kurang berfungsi dengan baik, karena motilitasnya terganggu. Integrin $\alpha\beta_3$ salah satu berfungsi untuk pergerakan, perlekatan sel resorpsi tulang ke daerah resorpsi melalui ikatannya pada sequen pengenalan integrin yaitu RGD dalam membrane ekstraselular. RGD merupakan rangkaian tripeptida yang terdapat pada protein non kolagen yang terdapat di dalam matriks tulang yaitu osteopontin dan bone sialoprotein. Integrin $\alpha\beta_3$ mempunyai afinitas yang terhadap teripeptida yang mempunyai daerah residu *polyaspartic acid site*. Orsteopontin merupakan protein non kolagen yang mempunyai residu

polyaspartic acid site. Oleh karena itu karena pada tikus yang diberi minyak ikan walaupun diinduksi LPS, osteoklasnya tetap rendah, karena OPN di daerah tersebut juga rendah. Gambaran integrin dan osteoklas dapat di lihat pada gambar 4.



Gambar 4. Gambaran integrin $\alpha v \beta_3$ dan osteoklas serta osteoblas (gambar A,B,C, dengan IHC, sedangkan D,E,F menggunakan pengecatan HE. Pembesaran 100x) Keterangan gambar. A,D: kelompok kontrol, terlihat integrin yang tipis dan sedikit, serta osteoblas (D) yang tampak banyak), B,E: kelompok yang diinduksi LPS, terlihat bahwa Integrin lebih tebal dan menyebar disepanjang tulang, hal itu juga ditunjukkan pada gambar D yang terlihat bahwa osteoklas nampak berjajar disepanjang tulang alveolaris. C,F: kelompok yang diinduksi LPS dan diberi minyak ikan, nampak integrin yang tipis sekali, dan osteoblas yang melimpah di gambar (F).

Data yang telah dikumpulkan dilakukan uji dengan Kruskal Wallis. Yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil analisis integrin $\alpha v \beta_3$ yang diuji dengan Kruskal Wallis.

	KELOMPOK
Chi-Square	8.502
df	2
Asymp. Sig.	.014

a Kruskal Wallis Test
b Grouping Variable: HARI

Dari tes statistic diketahui bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Hal ini dapat dikatakan bahwa minyak ikan dapat menghambat ekspresi integrin $\alpha v \beta_3$. Rendahnya osteoklas pada daerah resorpsi yang disertai dengan rendahnya rendahnya integrin $\alpha v \beta_3$, maka menyebabkan osteoblas banyak proliferasi dan berdiferensiasi serta bermigrasi ke daerah tersebut. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Indahynai, dkk., 2009, yang menunjukkan bahwa minyak ikan lemuru menunjukkan terjadi peningkatan osteoblast.

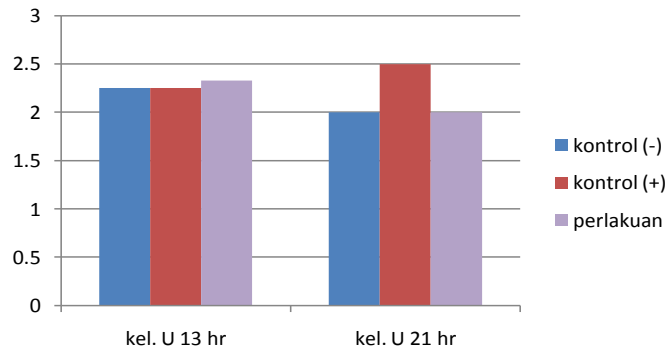
Osteoblas merupakan sel yang berfungsi pada pembentukan tulang. Osteoblas yang aktif/matur akan mensekresi matriks tulang yang berupa kolagen tipe I dan pteoin-protein non kolagen lainnya. Untuk itu pada penelitian ini juga dilakukan analisis terhadap pembentukan kolagen dengan menganalisis terhadap ekspresi terhadap matriks metaloproteinase (MMP-1). Enzim ini memecah kolagen menjadi segmen yang kecil, yang difagosit oleh fibroklas, dimana mereka selajutnya dipecahkan oleh system phagosomal dari fibroklas (Davis, 1986).). Sitokin *Interleukin 1-beta* (IL-1 β) dan *Tumor Necrosis Factor-alfa* (TNF- α) memiliki aksi proinflamatori seluler yang meliputi produksi kolagenase (MMP-1) (James *et al*, 2000). Sekresi mediator peradangan seperti sitokin dan prostaglandin akan memberikan respons terproduksinya beberapa *matrix metalloproteinase* (MMPs) (Carranza *et al.*, 2003). Hasil penelitian dapat di lihat pada Tabel 3.

Tabel 3 Skor penilaian Ekspresi MMP-1

No.	Pengelompokan Sampel		UI	UII	UIII	UIV	\bar{X}
1	Kontrol	13 Hari	2	2	2	3	2.25
		21 Hari	2	2	2	-	2
2	Diinduksi LPS	13 Hari	2	1	3	3	2.25
		21 Hari	3	3	2	2	2.5
3	Diinduksi LPS dan Minyak Ikan	13 Hari	3	2	2	-	2.33
		21 Hari	3	1	2	2	2

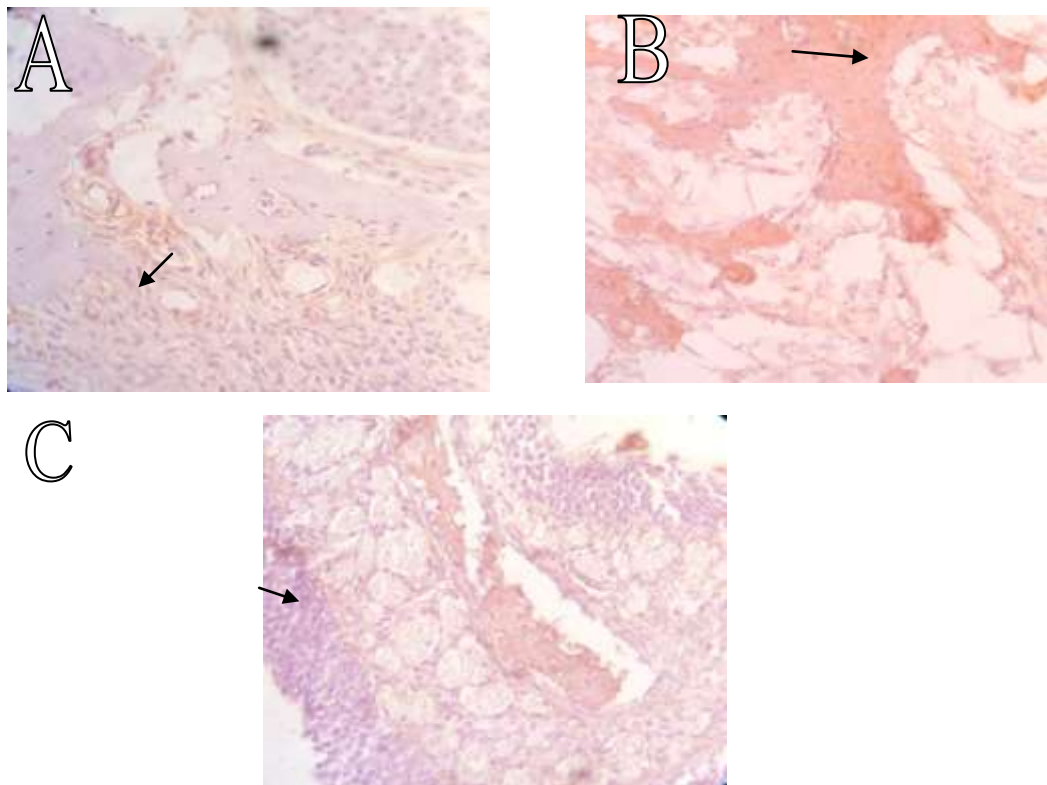
Keterangan: 1= Positif lemah
 2= Positif sedang
 3= Positif Kuat
 (-) = Tikus mati sebelum dekapitasi
 U= Ulangan
 X= rata-rata

Dari table dapat dijelaskan bahwa rerata skor MMP-1 pada kelompok tikus yang diinduksi LPS mempunyai ekspresi MMP-1 lebih tinggi dibandingkan yang lain. sedangkan pada kelompok yang diberi minyak ikan disertai di induksi dengan LPS, menunjukkan bahwa pada hari ke 21 mempunyai rerata yang sama dengan kelompok control, sedangkan pada hari ke 13 mempunyai skor MMP-1 mempunyai nilai yang lebih tinggi dari kelompok control walaupun tidak seringgi di kelompok yang diinduksi dengan minyak ikan. Apabila di gambarkan dengan histogram Nampak perbedaan yang jelas. Adapaun gambarnya dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Histogram skor MMP-1

Gambaran dari hasil analisis menggunakan penegcatan dengan imunohistokimia, dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Ekspresi MMP-1 pada tulang alveolar kelompok umur 13 hari, perbesaran 400X dengan pewarnaan imunohistokimia (kromogen DAB), coklat berarti (+);
 Keterangan Gambar: A. Ekspresi MMP-1 kelompok Kontrol negatif (tanpa perlakuan) nampak coklat sedang menyebar; B. ekspresi MMP-1 kelompok kontrol positif (diinduksi LPS) tampak coklat padat tebal; C. ekspresi MMP-1 kelompok perlakuan (diinduksi LPS dan Minyak ikan) tampak tipis.

Analisis statistik *Kruskal Wallis Test* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Selain itu dilakukan uji statistik *Mann-Whitney Test* untuk membedakan kelompok 13 hari dan 21 hari. Perbedaan dikatakan bermakna jika $p < 0,05$. Hasil uji statistik dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Ringkasan Hasil uji statistik pada ekspresi MMP-1 pada tikus wistar

	Sig.
Antar kelompok umur 13 hari	0.978
Antar kelompok umur 21 hari	0.143
Antara kelompok umur 13 hari dan Kelompok umur 21 hari	0.438

Minyak ikan lemuru menurunkan ekspresi MMP-1 pada tulang alveolar tikus wistar dengan periodontitis pada masa erupsi gigi. Periodontitis pada penelitian ini dibuat dengan cara menginduksi Lipopolisakarida (LPS) dari bakteri *E.colli* pada tulang alveolar bagian posterior dimana benih gigi molar tikus berada. Ekspresi MMP-1 (kolagenase) dikaitkan dengan keberadaan osteoklas, osteoblas, fibroblas, dan kolagen. Hal ini sesuai dengan pernyataan Carranza (2003) yaitu *Matriks metalloproteinase* (MMPs) dikeluarkan sebagai proenzim tidak aktif terutama dari fibroblas (MMP-1) dan leukosit, termasuk monosit (MMP-1) dan neutrofil (MMP-8), yang menyebabkan destruksi jaringan ikat periodontal (fibroblas) dan resorpsi tulang alveolar pada kondisi periodontitis. Haras (2008) menyatakan bahwa osteoklas menghasilkan asam, kolagenase, dan enzim proteolitik lain yang menyerang matriks tulang dan membebaskan substansi dasar dan secara aktif terlibat dalam pembersihan debris yang terjadi selama resorpsi tulang. Adanya peningkatan osteoklas juga menyebabkan peningkatan produksi dari kolagenase.

Hasil penelitian pada kelompok kontrol control tidak memiliki perbedaan yang bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan. Kandungan minyak ikan (EPA dan DHA) menunjukkan adanya penurunan ekspresi MMP-1 dalam resorpsi tulang alveolar, namun perbedaannya tidak

signifikan. Pada keadaan ini osteoklas dan osteoblas bekerja seimbang pada kelompok perlakuan karena adanya pemberian minyak ikan lemuru yang mengandung EPA dan DHA sebagai penekan mediator inflamatori dimana osteoblas dan osteoklas berperan dalam pelepasan MMP-1. Ketidakseimbangan mineralisasi sering ditemukan karena adanya inflamasi, keganasan maupun proses degenerasi (Fohr, *et al*,2003). Respon tulang alveolar terhadap inflamasi terjadi pada saat pembentukan dan resorpsi tulang, sehingga kehilangan tulang pada penyakit periodontal bukan hanya proses destruksi yang simpel tetapi merupakan hasil dari resorpsi predominan diatas pembentukan tulang. Pembentukan tulang baru rata-rata memperlambat kehilangan tulang dan mengganti sebagian tulang dan mengganti sebagian tulang yang rusak karena inflamasi (Carranza, 2003)

Adanya penurunan ekspresi MMP-1 pada kelompok yang diinduksi LPS dan diberi minyak ikan, menunjukkan adanya penurunan osteoklas yang signifikan.. Menurut Indahyani (2008) peningkatan EPA dan DHA pada membrane sel dan penurunan *Asam Arakhidonat* (AA) yang merupakan prekursor PGE₂ (Prostaglandin E-2). Penurunan PGE₂, IL-1 maupun TNF α menyebabkan pembentukan osteoklas pada tulang alveolar terhambat, oleh karena itu terjadinya erupsi prematur gigi dapat dicegah. Peningkatan EPA dan DHA tersebut menyebabkan peningkatan produksi eikosanoid yang bersifat non inflamasi yaitu Tromboksan A-5 (TBX₅), Leukotrin B-4 (LTB₄), dan Prostaglandin E-3 (PGE₃) yang secara bermakna telah menurunkan Tromboksan A-2 (TBX₂), PGE₂, IL-1, dan TNF- α . PGE₂ dan PGE₃ mempunyai stabilitas dan struktur yang mirip, tetapi PGE₃ kurang efisien dalam melakukan proliferasi sel fibroblas, menstimuli pembentukan sitokin dan menginduksi ekspresi gen siklooksigenase (COX₂) dibandingkan PGE₂ (Indahyani,2008).

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

Minyak ikan lemuru terbukti menurunkan ekspresi integrin αv betha 3 yang diikuti dengan penurunan matriks metalloproteinase, yang merupakan enzim untuk menghancurkan kolagen.

2. Saran

Untuk menghasilkan produk minyak ikan lemuru sebagai bahan terapi tulang, di sarankan untuk dilakukan penelitian menegani biokompatibilitasnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Diucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Universitas Jember, yang telah memberikan grand untuk sumber dana DIPA tahun anggaran 2010, sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik. Terimakasih juga disampaikan kepada semua sejawat dan tim yang telah menyelesaikan penelitian ini dengan usaha yang sangat keras.

DAFTAR PUSTAKA

- Anan, H., Akamine, A., Maeda, K., 1993, An Enzyme Histochemical Study of the Behavior of Rat Bone Cells during Experimental Apical Periodontitis, *J Endodon.*, 19(10): 83-86
- Anderson, HC., 1997, An Antagonist of Osteoclast Integrins Prevents Experimental Osteoporosis, *J.Clin. Invest.*, 99(9): 2059
- Amri, W., Limbah yang Menghasilkan Uang, www.indonesia.com/intisari, (diakses tanggal 3 Maret 2006)
- Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M., Miyake, K., 2000, Cutting Edge: Cell Surface Expression and Lipopolysaccharide Signaling Via the Toll-Like Receptor 4-MD-2 Complex on Mouse Peritoneal Macrophages. *J Immunol.*, 164: 3471-3475
- Argarwal, S., Baran, C., Piesco, NP., Uintero, JC., Langkamp, HH., Johns, LP., Chandra, CS., 1995, Synthesis of Proinflammatory Cytokines by Human Gingival Fibroblasts in Response to Lipopolysaccharides and Interleukin-1 β , *J Periodont Res.*, 30: 382-389
- Baron, R., 2006, Anatomy and ultrastructure of bone histogenesis, growth and remodeling, www.endotext.org/parathyroid/parathyroid1/chOISO2.html, (diakses tanggal 25 Juni 2007)
- Biosci F., 1998, Integrins and bone--cell adhesion and beyond, Aug 1;3:d757-68.
- Blair, HC., Zaidi, M., Schlesinger, PH., 2002 Mechanisms Balancing Skeletal Matrix Synthesis and Degradation, *Biochem J.*, 364: 332-341
- Calder, PC., 1997, n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cytokine production in Health and Diseases, *Ann-Nutr. Metab.*, 41(4): 203-234.
- Calder, PC., 2003, Long-Chain n-3 Fatty Acids and Inflammation: Potential Application in Surgical and Trauma Patients, *Braz J Med Biol Res*, 36(4):433-446
- Cheng SL., Lai CF., Blystone SD., Avioli LV., 2001, Bone Mineralization and Osteoclast Differentiation are Negatively Modulated by Integrin $\alpha\beta_3$, *J. Bone Miner. Res.*, 16: 277
- Cohen, J.S., Reader, A., Fertel, R., Beck, M., Meyers, WJ., 1985, A radioimmunoassay Determination of The Concentrations of Prostaglandin E2 and F2 α in Painful and Asymptomatic Human Dental Pulps., *J Endod.*, 11: 330-335
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, AL., Karsenty, G., 1997, Osf2/Cbfa 1: a Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation, *Cell*, 89: 747-754
- Estiasih, T., 1996, Mikroenkapsulasi Konsentrat Asam Lemak Omega 3 dari Limbah Cair Pengalangan Ikan Lemuru, Thesis, Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada
- Faccio, R., Takeshita, S., Zallone, A., Ross PF., Teitelbaum, SL., 2003, c-Fms and the $\alpha\beta_3$ Integrin Collaborate during Osteoclast differentiation, *J.clin.Invest.*, 111:749-758

- Fohr, B., Dunstan, CR., Seibel, MJ., 2003, Marker of Bone Remodeling in Metastatic Bone Diseases, *J Clin Endocrinol Metab.*, 88: 5059-5075
- Gao, YH., Shinki, T., Yuasa, T., Kataoka-Enomoto, H., Komori, T., Suda, T., Yamaguchi, A., 1998, Potential Role of Cbfa1, an Essential Transcriptional Factor for Osteoblast Differentiation, in Osteoclastogenesis: Regulation of mRNA Expression of Osteoclast Differentiation Factor (ODF), *Biochem Biophys Res Commun.*, 252: 697-702
- Geibel, MA., Schu, B., Callaway, AS., Gleissner, C., Willershausen, B., 2005, Polymerase Chain Reaction-based Simultaneous Detection of Selected Bacterial Species Associated With Closed Periapical Lesions, *Eur J Med Res.*, 10(8):333-338.
- Gonzalez-Moles, MA., Gonzales, NM., 2004, Bacterial Infections of Pulp and Periodontal Origin, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 34(6) (suppl): 32-34
- Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, Richards N, Babcock C, Schaller M, Cesena T, 2002, Fire and ICE: The role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol* 20, (Suppl 26):S45–S53.
- Grzesik WJ., dan Robey PR., 1994, Bone Matrix RGD Glycoproteins: Immunolocalization and Interaction with Primary Osteoblastic Cells in Vitro., *J. Bone Miner. Res.* 9: 487
- Hargreaves, JA., Cleaton-Jones, PE., Williams, SDL., 1989, Hypocalcification and Hypoplasia in Permanent Teeth of Children From Different Ethnic Groups in South Africa Assessed With a New Index, *Adv Dent Rest.*, 3(2):126-131
- Hunter, GK., Kyle, CL., Goldberg, HA., 1994, Modulation of Crystal Formation by Bone Phosphoproteins: Structural Specificity of The Osteopontin-Mediated Inhibition of Hydrxyapatite Formation, *Biochem J.*, 300:723-728
- Hughes, DA., Southon, S., Pinder, AC., 1996, (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Modulate the Expression of Functionally Associated Molekule on Human Monocytes *in-vitro*, *J. Nutr.*, 126:603-610
- Imai, M., Murakami, Y., Nagano, K., Nakamura, H., Yoshimura, F., 2005, Major Outer Membrane Proteins from *Porphyromonas gingivalis*: Strain Variation, Distribution, and Clinical Significance in Periradicular Lesions, *Eur J Oral Sci.*, 113(5):391-399.
- Indahyani, DE., Pudyani, PS., Santoso, ALS., Jonarta, AL., Sosroseno, W., 2002, The Effect of Fish Oil on Bone Resorption Following Pulp Exposure in Rats, *Dent Traumatol*, 18: 206-211
- Indahyani, DE., Santoso, ALS., Utoro, T., Soesatyo MH., 2007a, Lipopolysacharide (LPS) introduction during growth and development period of rat's tooth toward the occurrence of enamel hypoplasia, *Dent J (Maj Ked Gigi) FKG-Unair*, 40 (2): 85-88.
- Indahyani, DE., Santoso, ALS., Utoro, T., Soesatyo, MH., 2007b, Pengaruh Induksi Lipopolisakarida (LPS) terhadap Osteopontin Tulang Alveolaris Pada Masa Erupsi Gigi, *IJD FKG-UI*, 14 (1): 2-7.
- Indahyani, DE., 2008, Pengaruh Pemberian Minyak Ikan terhadap Proses Erupsi Gigi dengan Infeksi Tulang Alveolaris pada Tikus yang Diinduksi Lipopolisakarida (LPS) (*kajian pada ekspresi bone sialoprotein, osteopontin dan fase erupsi gigi*), *Disertasi*, Universitas Gadjahmada.

- Ishihara, Y., Nishihara, T., Maki, E., Noguchi, T., Koga, T., 1991, Role of Interleukin-1 and Prostaglandin in *in vitro* Bone Resorption Induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Lipopolysaccharide, *J Periodont Res.*, 26: 155-160
- Iwami-Morimoto, Y., Yamaguchi, K., Tanne, K., 1999, Influence of Dietary n-3 Fatty Acid on Experimental Tooth Movement in Rats (abstrac), *Anggle-Orthod.*, Aug, 69(4): 365-71
- Janeway, CA., Tarvers, P., Walport, M., Shlomchik, M., 2001, *Immuno Biology*. 5th Ed. New York: Garland Publishing : 67-68
- Jiang, J., Zuo, J., Hurst, IR., Holliday, SL., Gainesville, 2003, The Sinergistic Effect of Peptidoglycan and Lipopolysaccharide on Osteoclast Formation, *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 96: 738-743
- Kuzushima M., Mogi M., Togari, A., 2006, Cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis in mouse osteoblastic cells: Involvement of p38MAP kinase, *Arc. of Oral Biol.*, 51(11): 1048-1053
- Kuswadari, S., 2006, Profil Kesehatan Gigi Anak Pra-sekolah di Kota Yogyakarta, *Maj Ked Gigi*, 13(2): 131-136
- Lakio, L., Paju, S., Alfthan, G., Tirola, T., Asikainen, S., Pussinen, PJ., 2003, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Serotype d-Specific Antigen Contains the O Antigen of Lipopolysaccharide, *Infect Immun.*, 71(9): 5005-5011
- Lerner, UH., 2004, New Molecules in The Tumor Necrosis Factor Ligand and Receptor Super Families with Importance for Physiological and Pathological Bone Resorption, *Crit Rev Oral Biol Med.*, 15(2): 64-81
- Lim YJ., Taylor AF., Li Z., Vogler EA., Donahue HJ., tth, Integrine expression and Osteopontin regulation in Human Fetal Osteoblast Cell Mediated by Substratum Surface Characteristic, Revision to Tissue Engineering (Manuscript no TE1017), www.pms.psu.edu/~vogler/preprint_pdfs/integrine_expression.pdf (di download tanggal 18 November 2010)
- Lucchini MM., Couble L., Romeas A.M.-J. Staquet, F. Bleicher, H. Magloire, and J.-C. Farges, 2004, alpha v betha 3 Integrin Expression in Human Odontoblasts and Co-ocalization with Osteoadherin, *J Dent Res* 83(7):552-556, 2004
- Manolagas, SC., 2000, Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanism and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis, *Endocr Rev.*, 21(2):115-137
- Mariathan S, 2007, ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: Bonafide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes Infect* 9:664–671.
- Meydani, S.N., Endres, S., Woods, M.M., Goldin, B.R., Soo, C., Morrill-Labrode, A., Dinarello, C.A., and Gorbach, S.L., 1991, Oral (n-3) Fatty Acid Supplementation Supresses Cytokine Production and Lymphocyte Proliferation: Comparation Between Young and Older Women, *J. Nutr.*, 121:547-555
- McCall SH, Sahraei M, Young AB., Worley SC., Duncan JA., Pan-Yun Ting J., Marriott I., 2008, Osteoblasts Express NLRP3, a Nucleotide-Binding Domain and Leucine-Rich Repeat Region Containing Receptor Implicated in Bacterially Induced Cell Death, *J. bone and min. Res.*, 23:1

- McDonnell, ST., Liversidge, H., Kinirons, M., 2004, Temporary arrest of root Development in Premolar of a Child With Hypodontia and Extensive Caries, *Int J of Paed Dent*, 14 :455-460
- McNamara, CM., Foley, TF., Garvey, MT., Kavanagh, P.T., 1999, Premature Dental Eruption : report of Case, *J of Dent for Child.*, Jan-Feb: 70-72
- Miyauchi, M., Ijuhin, N., Nikai, H., Takata, T., Ito, H., Ogawa, I., 1992, Effect of Exogenous Applied Prostaglandin E-2 on Alveolar Bone Loss- Histometric Analysis, *J Periodontol*, 63:405-411.
- Mühlbauer, RC., Fleisch, H., 1990, A Method For Continual Monitoring of Bone Resorption in Rats: Evidence for a Diurnal Rhythm, *Am J Physiol.*, 259: R679-89
- Mundy, R., 1991, Inflammatory Mediator and The Destruction of Bone, *J. Periodont Res.*, 26: 213-217
- Mungrue IN, Brecht DS, Stewart DJ, Husain M, 2003, From molecules to mammals: what's NOS got to do with it. *Acta Physiol scand* , 179:123-135.
- Nicolau, B., Marcenes, W., Bartley, M., Sheiham, A., 2003, A Life Course Approach to Assessing Causes of Dental Caries Experience: The Relationship between biological, Behavioral, Socio-Economic and Psychological Conditions and Caries in Adolescents, *Caries Res.*, 37:319-326.
- Nik-Hussein, NN., Abdul Muttalib, K., Junid, NZ., Mohamed Nasir Wan Othman Wan, Abang A., 2004, Oral Health Status of 16-year-old School Children in Malaysia, *Singapore Dent J.*, 26(1):30-38
- Ne, R.F., Witherspoon, D.E., Gutmann, J.L., 1999, Tooth Resorption, *Quintessence Int.*, 30: 9-25
- Offenbacher, S., Heasman, PA., Collins, JG., 1993, Modulation of Host PGE-2 Secretions as a Determinant of Periodontal Disease Expression, *J Periodontol.*, 64: 432-444.
- Reinwald, S., Li, Y., Moriguchi, T., Salem Jr, N., Watkins, BA., 2004, Repletion with (n-3) Fatty Acids Reverses Bone Structural Deficits in (n-3)-Deficient Rats, *J Nutr.*, 134:388-394
- Sakata T, Wang Y, Halloran BP, Elalieh HZ, Cao J, Bikle DD., 2004, Skeletal unloading induces resistance to insulin-like growth factor-I (IGF-I) by inhibiting activation of the IGF-I signaling pathways. *J Bone Miner Res* 19: 436–446,
- Schwartz, Z., Goultschin, J., Dean, DD., Byan, BD., 1997, Mechanisms of Alveolar Bone Destruction in Periodontitis *dalam* The Pathogenesis of Periodontitis, Hubert E Schroeder (eds), *Periodontology 2000*, 14:158-172.
- Schwartzman RA, Cidlowski JA, 1993, Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*, 14:133-151
- Stashenko, P., 1990, The Role of Immune Cytokines in The Pathogenesis of Periapical Lesions, *Endod Dent Traumatol.*, 6: 89-96
- Stashenko, P., 2002, *Interrelationship of Dental Pulp and Apical Periodontitis*, (dalam Dental Pulp, di edit oleh Kenneth M.Hargreaves dan Harold E. Goodis), Quintessence Publishing Co, Inc., Chicago
- Stevens, A., Lowe, JS., 1997, *Human Histology*, Mosby, London

- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, MT., Martin, TJ., 1999, Modulation of Osteoclast Differentiation and Function by the New Members of the Tumor Necrosis Factor Receptor and Ligand Families, *Endocr Rev.*, 20(3): 345-357
- Seymour, GJ., Savage, NW., Walsh, JJ., 1995, *Immunology: An Introduction for The Health Science*, Mcpherson's Printing Group, Australia
- Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Galan JE, Askenase PW, Flavell RA, 2006, Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 24:317–327.
- Tandon P, Mahajan A., Singh JB., Verma S., 2005, Alpha v Betha 3 Integrin : A Novel Target Therapeutics in Rheumatoid Arthritis, *New Horison*, 7(2): 61-2
- Takayama, S.I., Yasuo, M., Shimauchi, H., Okada, H., 1996, Relationship between Prostaglandin E2 Concentrations in Periapical Exudates from Root Canals and Clinical Findings of Periapical Periodontitis, *J Endod.*, 22(12):677-680
- Tani-Ishii, N., Wang, CY., Stashenko, P., 1995, Immunolocation of Bone-Resorptive Cytokines in Rat Pulp and Periapical Lesions Following Surgical Pulp Exposure, *Oral Microbiol Immunol.*, 10:213-219
- Umezu, A., Kaneko, N., Toyama, Y., Wanatabe, Y., Itoh, H., 1989, Appearance of Osteoclast by Injections of Lipopolysaccharides in Rat Periodontal Tissue, *J Periodont Res.*, 24: 378-383
- Vermes, I. dan Haaen., C., 1994. Apoptosis and programmed cell death in health and disease. *Adv. Clin. Chem.* 31: 177-246.
- Wan, AKL., Seow, WK., Purdie, DM., Bird, PS., Walsh, LJ., Tudehapse, DI., 2003, A Longitudinal Study of Streptococcus mutans Colonization in Infants after Tooth Eruption, *J Dent Res.*, 82(7):504-508
- Wang, CY., Stashenko, P., 1993, The Role of Interleukin-1 α in The Pathogenesis of Periapical Bone Destruction in a Rat Model System, *Oral Microbiol Immunol.*, 8: 50-56
- Watkins, BA., Shen, CL., Allen, KGD., Sweifert, MF., 1996, Dietary (n-3) and (n-6) Polyunsaturated and Acetylsalicylic Acid Alter ex vivo PGE2 Biosynthesis, Tissue IGF-1 Level, and Bone Morphometry in Chicks, *J Bone Miner Res.*, 11:1321-1332
- Watkins, BA., Li, Y., Allen, KGD, Hopffmann, WE., Seifert, MF., 2000, Dietary of (n-6)/(n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Alters The Fatty Acid Composition of Bone Compartements and Biomarkers of Bone Formation in Rats, *J.Nutr.*, 130:2274-2284.
- Weinstein, RS., Jilka, RL., Parfitt, M., Manolagas, SC., 1998, Inhibition of Osteoblastogenesis and Promotion of Apoptosis of Osteoblast and Osteocytes by Glucocorticoids, *J. Clin. Invest.*, 102: 274-282
- Weiss, LA., Barrett-Connor, E., von Muhlen, D., 2005, Ratio of n-6 to n-3 Fatty Acids and Bone Mineral Density in Older Adults: The Rancho Bernardo Study, *American J. of Clin Nutr*, 81(4): 934-938
- White, PA., Nair, SP., Kim, Mi-Jurung, Wilson, M., Henderson, B., 1998, Molecular Characterization of an Outer Membrane Protein of *Actinobacillus*

- actinomycetemcomitans* Belonging to the OmpA Family, *Infect Immun.*, Jan : 369-372
- Yoshimura, A., Hara, Y., Kaneko, T., Kato, I., 1997, Secretion of IL-1 β , TNF- α , IL-8 and IL-1ra by Human Polymorphonuclear Leukocytes in Response to Lipopolysaccharides from Periodontopathic Bacteria, *J Periodont Rest.*, 32: 279-286
- Yunizal, JT., Murtini, Suparno, S., Saleh, M., Tampubolon, YN., Fawzya, HE., Irianto, TD., Suryaningrum, N., Fadi, B., Purdiwoto, Sabarudin., 1996, Pengolahan Konsentrat Asam Lemak n-3 dari Hasil Samping Pengalengan dan Penepungan Ikan Lemuru (*Sardenella longiceps*), *Laporan teknis*, Balai Penelitian Perikanan Laut, Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan, Jakarta.
- Zheng, MH., Papadimitriou JM., Nicholson GC., 1991, A Quantitative Cytochemical Investigation of Osteoclast and Multinucleate Giant Cells, *Histochem J.*, 23: 180-88
- Ziegle-Heitbrock HWL., Ulevitch RJ., 1993, CD14: Cell surface receptor and differentiation Marker, *Immunol Today*, 14:121-5.

