



Airlangga University



HIROSHIMA UNIVERSITY



UNIVERSITY  
OF MALAYA

*The Leader in Research & Innovation*

# Joint Scientific Meeting in Dentistry (JSMiD)

“New Vision in Oral Health - Present and Future”  
Sheraton Hotel Surabaya, May 15<sup>th</sup> - 16<sup>th</sup>, 2010





**JOINT SCIENTIFIC MEETING** *in Dentistry*  
"New Vision in Oral Health-PresentFuture"  
Sheraton Hotel Surabaya, 15-16 Mei 2010

## Joint Scientific Meeting in Dentistry (JSMiD)

**Sheraton Hotel Surabaya, May 15<sup>th</sup> 16<sup>th</sup>, 2010**

**Secretariate JSMiD :**

Ruang TIMNAS FKG Universitas Airlangga

Jl.Mayjen Prof.Dr.Moestopo No.47

Surabaya-60132

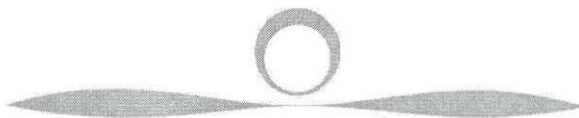
East Java - Indonesia

Phone : 031-5030255

Fax : 031-5020256

Website : [fkg.unair.ac.id/jsmid](http://fkg.unair.ac.id/jsmid)

Email : [jsm\\_id@yahoo.com](mailto:jsm_id@yahoo.com)





**JOINT SCIENTIFIC MEETING** *in Dentistry*  
“New Vision in Oral Health-PresentFuture”  
Sheraton Hotel Surabaya, 15-16 Mei 2010

# CONTENTS

1.	Contents .....	1
2.	Introduction .....	5
3.	Organization Committee .....	8
4.	Program Information JSMiD .....	10
5.	Exhibition Map and Sponsorship .....	12
6.	Main Lecture Schedule .....	16
7.	Table Clinic Schedule .....	20
8.	Abstract .....	22



### **Chairman Committee Joint Scientific Meeting in Dentistry**

Dear Colleagues,

It is a great honor and a distinct pleasure to invite you to participate in the 1<sup>st</sup> Joint Scientific Meeting in Dentistry which is organized by Airlangga University, Indonesia.

There are some scientific programs, table clinis, and exhibition of dental equipments. The main speakers are from Hiroshima, Malaya and from Indonesia. More than 20 papers are presented in poster presentation. It contains research reports, literature studies and case reports in the field of dentistry.

We hope the meeting would give all the colleagues a great benefit for improving and refreshing knowledge in treating patients.

Enjoy the meeting

**Ketut Suardita, drg., Sp.KG., Ph.D**  
**Committee**

## JSMiD ORGANIZATION COMMITTEE

Patron	: Prof.Dr.Ruslan Effendy,drg.,MS.,Sp.KG(K) (Dean of Faculty of Dentistry Airlangga University)
Adviser	: - Prof.Dr.Latief Mooduto,drg.,MS.,Sp.KG(K) (Vice Dean I of Faculty of Dentistry Airlangga University) - Jusuf Sjamsudin,drg.,Sp.Ort(K) (Vice Dean II of Faculty of Dentistry Airlangga University) - Seno Pradopo,drg.,Sp.KGA(K),Ph.D (Vice Dean III of Faculty of Dentistry Airlangga University)
Chairman	: Ketut Suardita,drg.,Sp.KG.,Ph.D
Secretary I	: Ervina Restiwulan W,drg.,Sp.Ort
Secretary II	: Deny Saputra,drg
Treasure	: Karlina Samadi,drg.,MS.,Sp.KG(K)
Scientific Section	: Annissa Chusida,drg.,M.Kes Udijanto Tedjosasongko,drg.,Sp.KGA.,Ph.D Shafira Kumia Supandi,drg.,Sp.Perio
Registration Section	: Mega Moeharyono P,drg.,Sp.KGA Febriastuti Cahyani,drg.,Sp.KG
Programme Section	: Eka Fitria Agustina,drg.,Sp.Perio Galih Sampoerna,drg.,Sp.KG.,M.Kes
Fund Section	: M.Josef Kridanto,drg.,M.Kes.,Sp.Pros Bambang Agustono,drg.,M.Kes
Exhibition Section	: Harry Laksono,drg.,Sp.Pros Eric Priyo P,drg.,Sp.KG
Consumption Section	: Rini Devijanti,drg.,M.Kes Devi Eka Juniarti,drg.,Sp.KG
Accommodation & Transportation Section	: Lambang Bargowo,drg.,Sp.Perio
Site Publication & Documentation Section	: Hendrik Setiabudi,drg.,M.Kes Widya Saraswati,drg.,M.Kes
Equipment Section	: Agung Krismariono,drg.,Sp.Perio.,M.Kes

# INFORMATION

**Theme** : New Vision in Oral Health Present and Future  
**Time of the Day** : Saturday-Sunday, May 15<sup>th</sup>-16<sup>th</sup> 2010  
**Place** : Hotel Sheraton  
Jl. Embong Malang 25-31, Surabaya

## Activities

- ◆ **Main Scientific Lectures** by expert dental speakers from national and international universities
- ◆ **Short Lecture (Poster Presentation)** discussing research results, case reports between academics, practitioners and dental material or drugs manufacturers
- ◆ **Table Clinic** about recent techniques in dentistry
- ◆ **Current dental materials, drugs and technology exhibition**

## **Participants:**

- General Dentist
- Dentists Specialistic
- Students

## **SKP Joint Scientific Meeting in Dentistry (JSMiD)**

**SK Number: 367/SKP/PDGI.Sub/XII/2009**

Participant	: 6 SKP
Table Clinic Participant	: 3 SKP
Main Lectures	: 5 SKP
Poster/Short Lectures	: 5 SKP
Table Clinic Trainer	: 6 SKP
Committee Member	: 3 SKP
Lecture Moderator	: 2 SKP

carcinogenesis by the proliferative and apoptotic regulators in EBV infected SCC, like p53, c-myc and bcl-2. EBV Nuclear Antigen-1 (EBNA-1) is One of Gene Product of EBV Role to The Carcinogenesis. Detection of EBV was carried out by insitu hybridization and immunohistochemical analysis to find the expression of EBV Nuclear Antigen-1 (EBNA-1), P53i (P53inactive), C-myc and Bcl2. The Results of expression examination showed significant difference in the P53i, C-myc, Bcl-2 in oral SCC that was infected by EBV and non infected. Conclusion that EBNA-1 have roled to carcinogenesis mechanism by expression of P53, C-myc and Bcl2 in oral SCC. Suggested to describe another gene product of EBV.

Conclusion that EBNA-1 have roled to carcinogenesis mechanism by expression of P53, C-myc and Bcl2 in oral SCC. Suggested to describe another gene product of EBV.

**Keywords :** carcinogenesis, EBV, EBNA-1, oral SCC.

---

---

## FISH OIL REGULATES BONE SIALOPROTEIN AND OSTEOPONTIN IN ALVEOLAR BONE RESORPTION

**By:** Didin Erma Indahyani<sup>(1)</sup>, Ai. Supartinah Santoso<sup>(2)</sup>, Totok Utoro<sup>(3)</sup>, Marsetyawan HNE Soesatyo<sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup> Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Jember University, Jember 68121, Indonesia,

<sup>(2)</sup> Professor, Department of Pedodontic, Faculty of Dentistry, Gadjah Mada University, Yogyakarta 55281, Indonesia,

<sup>(3)</sup> Senior Lecturer, Department of Pathological Anatomy, Faculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta 55281, Indonesia,

<sup>(4)</sup> Professor, Department of Histology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta 55281, Indonesia,

### ABSTRACT

Previously research explained that fish oil decreased bone resorption. That are important entity on osteoclast and osteoblast recruitment in bone remodeling are osteopontin (OPN) and Bone sialoprotein (BSP). OPN and BSP have arginin-*glysin-aspartic acid*. They are important to cell adhesion, because can be recognized by bone cell integrine is  $\alpha_3\beta_3$ . Purpose of the research was to analyze the effect of fish oil to OPN and BSP functions.

Wistar rats, male, 5 days of age were divided into 3 groups. The first group was negative control (without treatment). The second group was positive control rats were injected with lipopolysaccharide (LPS) into left maxillary molar region. The third group, rats were injected with LPS and provided fish oil orally daily. Each of group was divided into three groups to decapitate on age of 13 days, 17 days and 21 days. Analyze of BSP and OPN used immunohistochemically. Statistic analyzes of BSP and OPN used Kruskal-Wallis test.

The result of research was known that expression of OPN was significantly ( $p < 0,05$ ) higher than BSP in rats injected with LPS. Rats were treated with fish oil and injected with LPS were significantly expression of BSP higher than OPN and were similar to untreated rats. Numbers of osteoclast was observed elevated in rats that its OPN expression was rather high. In contrary high BSP expression shown numbers of osteoclast lower than osteoblast. In conclusion that fish oil regulates bone resorption processing in way influenced BSP and OPN expression as signaling molecule on osteoclast and osteoblast activity in resorption area.

**Key words:** fish oil, bone resorption, bone sialoprotein, osteopontin

---

---

## Panoramic Common Positioning Errors

Sarianoferni \*, Endah Wahjuningsih\*\*

\**Laboratorium Radiologi Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah*

\*\**Laboratorium Anatomi Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah*

Panoramic tomography is widely used in dentistry that provides a unique patient view; covering the entire dentition and surrounding structures, the facial bones and condyles, and parts of the maxillary sinus and nasal complexes.

Proper positioning of the patient is crucial to obtaining quality diagnostic panoramic images. Deviation to standard positioning practices can result in substandard images; however, allowances may assist the practitioner in viewing particular anatomical areas of interest that otherwise would not be seen as clearly. This article reviews proper positioning. It continues to discuss some common errors and their result, as illustrated by radiographic examples. This will allow the practitioner to determine from the radiograph which the error occurred in the image creation process. This article will then suggest possible solutions to the problem, based on this information. The result will be panoramic radiographs with the maximum diagnostic detail and information that the equipment and technique allows.



# FISH OIL REGULATE BONE SIALOPROTEIN AND OSTEOPONTIN IN ALVEOLAR BONE RESORPTION

By: Didin Erma Indahyani <sup>(1)</sup>, Al. Supartinah Santoso<sup>(2)</sup>, Totok Utoro<sup>(3)</sup>, Marsetyawan HNE Soesaty<sup>(4)</sup>

<sup>(1)</sup> Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Jember University, Jember 68121, Indonesia,

<sup>(2)</sup> Professor, Department of Pedodontic, Faculty of Dentistry, Gadjah Mada University, Yogyakarta 55281, Indonesia,

<sup>(3)</sup> Senior Lecturer, Department of Pathological Anatomy, Faculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta 55281, Indonesia,

<sup>(4)</sup> Professor, Department of Histology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta 55281, Indonesia,

## ABSTRAK

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa fish oil dapat menurunkan terjadinya resorpsi tulang, dengan cara menurunkan aktivitas osteoklas. Ada hal penting pada proses rekrutmen osteoklas maupun osteoblas dalam remodeling tulang yaitu osteopontin (OPN) dan bone sialoprotein (BSP). OPN dan BSP mempunyai sekuen *arginin-glysin-aspartic acid* (Arg-gly-asp atau disebut juga RGD) berperan penting untuk adhesi sel yang dapat dikenali oleh integrin sel tulang yaitu  $\alpha_v\beta_3$ . Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis efek fish oil terhadap fungsi OPN dan BSP.

Penelitian dilakukan pada tikus dilakukan pada 3 kelompok tikus umur 5 hari. Kelompok I, sebagai kontrol (-) tikus tidak diberi perlakuan. Kelompok kedua tikus diinjeksi dengan lipopolisakarida (LPS) di regio molar rahang atas kiri sebagai kontrol positif. Kelompok ketiga di beri induksi diinjeksi LPS dan diberi minyak ikan per oral setiap hari sampai tikus dilakukan dekapitasi. Masing-masing kelompok dibagi lagi menjadi 3 kelompok untuk dilakukan dekapitasi pada umur 13 hari, 17 hari dan 21 hari. Analisis OPN dan BSP dilakukan secara imunohistokimia. Datanya dianalisis secara statistik menggunakan uji Kruskal Wallis.

Hasilnya menunjukkan bahwa tikus yang diinjeksi LPS secara bermakna ( $p < 0,05$ ) menunjukkan ekspresi OPN lebih tinggi daripada BSP pada tulang alveolarisnya. Tikus yang diinjeksi LPS dan diberi minyak ikan mempunyai ekspresi OPN lebih rendah daripada BSP. Osteoklas juga terlihat tinggi pada tikus yang ekspresi OPN juga tinggi. Sebaliknya ekspresi BSP yang lebih tinggi pada tikus menunjukkan jumlah osteoklas lebih sedikit tetapi osteoblasnya lebih tinggi. Disimpulkan bahwa minyak ikan dapat meregulasi proses resorpsi tulang dengan mempengaruhi ekspresi OPN dan BSP sebagai molekul signaling pada aktivitas osteoklas dan osteoblas di daerah resorpsi.

Kata kunci : fish oil, resorpsi tulang, bone sialoprotein, osteopontin

## ABSTRACT

Previously research explained that fish oil decreased bone resorption. Important entities on osteoclast and osteoblast recruitment in bone remodeling are osteopontin (OPN) and Bone sialoprotein (BSP). OPN and BSP have *arginin-glysin-aspartic acid*. They are

important to cell adhesion, that can be recognized by bone cell integrine is  $\alpha_v\beta_3$ . The purpose of the research was to analyze the effect of fish oil toward OPN and BSP functions.

The research was done on three groups Wistar rats, male, 5 days of age. The first group was negative control (without treatment). The second groups was positive control, The rats were injected with LPS into left maxillary molar region. Third group, The rats were injected with LPS and provided fish oil orally daily. Each of groups was divided into three groups to decapitate on ages of 13 days, 17 days and 21 days. Analyze of BSP and OPN used immunohistochemically. Statistics analyze of BSP and OPN used Kruskal-Wallis test.

The result of research showed that expression of OPN was significantly ( $p < 0,05$ ) higher than BSP in the rats injected with LPS. The rats treated with fish oil and injected with LPS were significantly expression of BSP higher than OPN and were similar to untreated rats. Numbers of osteoclast were observed elevated in rats that its OPN expression was rather high. In contrary, high BSP expression showed numbers of osteoclast lower than osteoblast. In conclusion that fish oil regulates bone resorption processing in way influenced BSP and OPN expression as signaling molecule on osteoclast and osteoblast activity in resorption area. Key words: fish oil, bone resorption, bone sialoprotein, osteopontin

Correspondence : Didin Erma Indahyani, Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry  
Jember University, Jl. Kalimantan No. 37 Jember. 68121.

E-mail : didinerm@yaho.com

## PENDAHULUAN

Resorpsi tulang penting untuk beberapa proses dalam tubuh, misalnya selama proses pertumbuhan tulang, erupsi gigi penyembuhan luka dan juga untuk mempertahankan level kalsium dalam darah.<sup>(1)</sup> Secara normal resorpsi tulang terjadi dalam jumlah yang kecil, dan disertai dengan proses deposisi. Aktivitas resorpsi tulang yang lebih besar dari deposisi tulang mengakibatkan kehilangan tulang atau kerusakan tulang. Peristiwa tersebut biasanya terjadi pada inflamasi, keganasan maupun proses degenerasi.<sup>(2)</sup> Di rongga mulut, kerusakan tulang bisa menyebabkan terjadinya gigi tanggal lebih dini dan fraktur rahang. Sel yang berperan pada proses resorpsi adalah osteoklas, sedangkan yang berperan pada deposisi tulang adalah osteoblas. Penurunan resorpsi ditimbulkan oleh keseimbangan kalsium dan kandungan mineral tulang lain yang dilakukan oleh osteoblas dan osteoklas.<sup>(3)</sup> Ada hal penting pada proses rekrutmen osteoklas maupun osteoblas dalam remodeling tulang diantaranya adalah osteopontin (OPN) dan *bone sialoprotein* (BSP).

OPN dan BSP merupakan protein non kolagen atau disebut juga sialoprotein yang mengalami fosforilasi sehingga dikatakan sebagai fosfoprotein matriks ekstraselular. OPN dan BSP terlibat dalam proses mekanisme pengaturan kalsifikasi jaringan normal maupun patologis, motilitas sel, adesi sel dan berperan pada proses remodeling tulang.<sup>(4)</sup> OPN dan BSP mempunyai sekuen *arginin-glycin-aspartic acid* (Arg-gly-asp atau disebut juga RGD) berperan penting untuk adhesi sel yang dapat dikenali oleh integrin sel tulang yaitu  $\alpha_v\beta_3$ .<sup>(5),(6)</sup> OPN memiliki daerah yang kaya residu asam aspartat yang berjajar-jajar dan disebut *polyaspartic acid site*, sedang BSP mempunyai residu asam glutamat yang disebut *polyglutamic acid site*.<sup>(7),(8)</sup>

Minyak ikan banyak mengandung n-3 *polyunsaturated fatty acid* (PUFA). n-3 PUFA menurunkan produksi sitokin proinflamatori dan eikosanoid dengan cara langsung mengganti asam arakhidonat (AA) yang merupakan substrat eikosanoid dan menghambat metabolisme AA, dan secara tidak langsung dapat mengubah ekspresi gen inflamatori melalui aktivitas faktor transkripsi. Oleh karena itu n-3 PUFA berpotensi sebagai antiinflamatori.<sup>(9)</sup> Watkins, dkk.<sup>(10)</sup> melaporkan bahwa diet tinggi n-3 PUFA mengakibatkan rendahnya produksi prostaglandin E-2 (PGE<sub>2</sub>) pada tulang tibia ayam dan kultur organ tulang. Diet tinggi n-3 PUFA pada tikus BALB, meningkatkan aktivitas serum isoenzim alkalin fosfatase, yang merupakan isoenzim spesifik dalam tulang (*bone-specific isoenzyme*), sehingga dikatakan bahwa diet n-3 PUFA meningkatkan pembentukan tulang.<sup>(11)</sup> Meydani, dkk.<sup>(12)</sup> menunjukkan bahwa produksi sitokin yaitu IL-1 $\beta$ , IL-6 dan TNF- $\alpha$  dari sel mononuklear secara bermakna lebih rendah pada manusia setelah mengkonsumsi minyak ikan.

Diet minyak ikan menghambat resorpsi tulang alveolaris pada tikus yang di lakukan pembukaan pada pulpa giginya<sup>(13)</sup> oleh karena terjadinya penurunan jumlah dan aktivitas preosteoklas serta osteoklas.<sup>(14)</sup> Iwami-Morimoto, dkk.<sup>(15)</sup> menyatakan diet minyak ikan selama 6 minggu, mampu menghambat pergerakan gigi. Suplemen EPA dan DHA pada tikus

menurunkan ekskresi deoksipiridolin dan hidroksiprolin dalam urin yang merupakan marker terjadinya degradasi tulang.<sup>(16)</sup> Pada tikus yang struktur tulangnya tidak sempurna oleh karena defisiensi n-3 PUFA yang kronik, kemudian disuplai dengan n-3 PUFA, 1 minggu kemudian akan terjadi perbaikan komposisi tulang.<sup>(17)</sup> *Bone Mineral Density* (BMD) pada orang tua laki-laki dan perempuan yang berumur antara 45-90 tahun dipengaruhi diet n-6 dan n-3 PUFA. Diet n-6 PUFA yang lebih tinggi dibanding n-3 PUFA menyebabkan BMD yang rendah pada tulang pinggul dan tulang belakang.<sup>(18)</sup>

Minyak ikan yang mampu menurunkan resorpsi tulang akibat aktivitas osteoklas dan rendahnya jumlah dan aktivitas osteoblas. Fungsi osteoklas dan osteoblas tersebut dipengaruhi oleh adanya protein nonkolagen yaitu OPN dan BSP. Oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis efek minyak ikan terhadap fungsi OPN dan BSP. Diharapkan penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar ilmiah untuk pemanfaatan minyak ikan secara medis khususnya pada terapi kelainan tulang.

## **BAHAN DAN METODE**

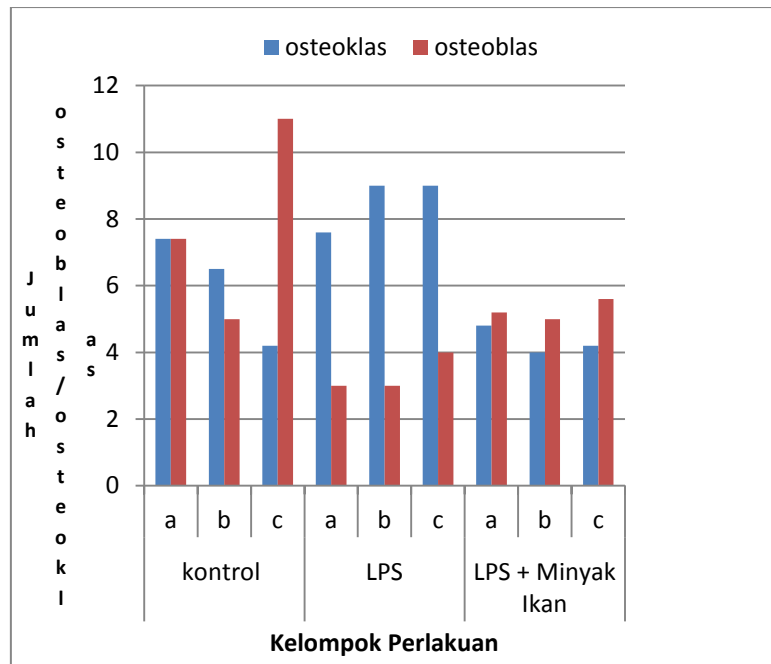
Tigapuluh ekor tikus Wistar Jantan, berumur 5 hari, dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok I, tikus yang tidak diberi perlakuan apapun (sebagai control negative). Kelompok II tikus diinjeksi dengan LPS *E coli* 0111 B4 (Sigma). LPS diinjeksikan pada tulang alveolaris di regio gigi molar rahang atas kiri, setiap 24 jam dengan dosis 5µg dalam PBS 0,05ml.<sup>(19)</sup> yang telah dimodifikasi yaitu dilakukan 8 kali injeksi. Kelompok III tikus diinjeksi dengan LPS seperti kelompok II dan diberi minyak ikan menhaden (Sigma), Minyak ikan Menhaden mengandung EPA dan DHA paling tinggi dibandingkan minyak ikan lainnya.<sup>(20)</sup> Minyak ikan diberikan setiap hari sejak tikus berumur 5 hari sampai didekapitasi. Dosis minyak ikan 1 ml/300-330gr berat badan tikus.<sup>(13)</sup> Minyak ikan diberikan secara peroral menggunakan sonde lambung dengan diameter ukuran 0,5mm. Masing-masing kelompok dibagi menjadi sub kelompok untuk didekapitasi sesuai dengan hari yang telah ditentukan yaitu 13, 17 dan 21

hari. Tikus yang telah dilakukan dekapitasi, rahang atas kiri diambil dan dibersihkan, kemudian dilakukan fiksasi dengan *Bouin's fixative* selama 24 jam. Spesimen didemineralisasi menggunakan asam asetat/formalin. Spesimen yang sudah didemineralisasi ditanam dalam blok parafin dan dipotong secara seri setebal 6µm dalam arah bukolingual dan diletakkan pada *slide* yang dilapisi dengan TES (*3-aminopropyltriethoxysilane*). Untuk analisis osteoblas dan osteoklas dilakukan pengecatan dengan Hematoksin eosin, sedangkan untuk analisis OPN dan BSP dengan imunohistokimia. Antibodi OPN dan BSP yang digunakan adalah *Mouse monoclonal antibody against rat BSP* dan *OPN* (antibodi monoklonal ini dikembangkan oleh Michael Solursh dan Ahnders Franzen yang diperoleh dari *The Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD, The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242*). Menggunakan kromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). Yang menunjukkan warna coklat adalah positif.

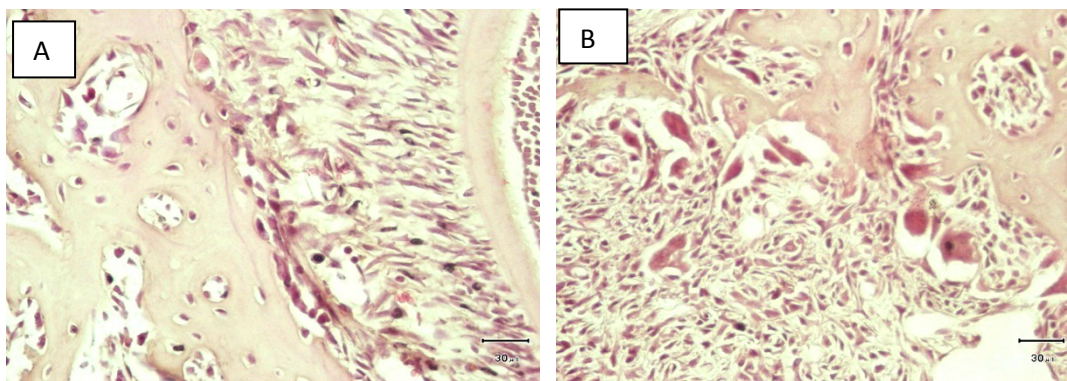
Analisis OPN dan BSP, dilakukan skoring sebagai berikut yaitu OPN dan BSP tidak terdeteksi adalah – (skor 0); OPN dan BSP terdeteksi lemah adalah + (skor 1); OPN dan BSP terdeteksi sedang ++ (skor 2); OPN dan BSP terdeteksi kuat +++ (skor 3).<sup>(21)</sup>

## **HASIL**

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini adalah tikus yang diinduksi LPS menunjukkan terjadinya peningkatan osteoklas secara bermakna ( $p < 0,05$ ). Jumlah osteoklas yang paling tinggi, terjadi pada tikus umur 13 hari di bandingkan dengan yang lain sedangkan osteoblas mempunyai jumlah yang paling rendah pada kelompok umur tersebut (Gambar 1 dan 2).



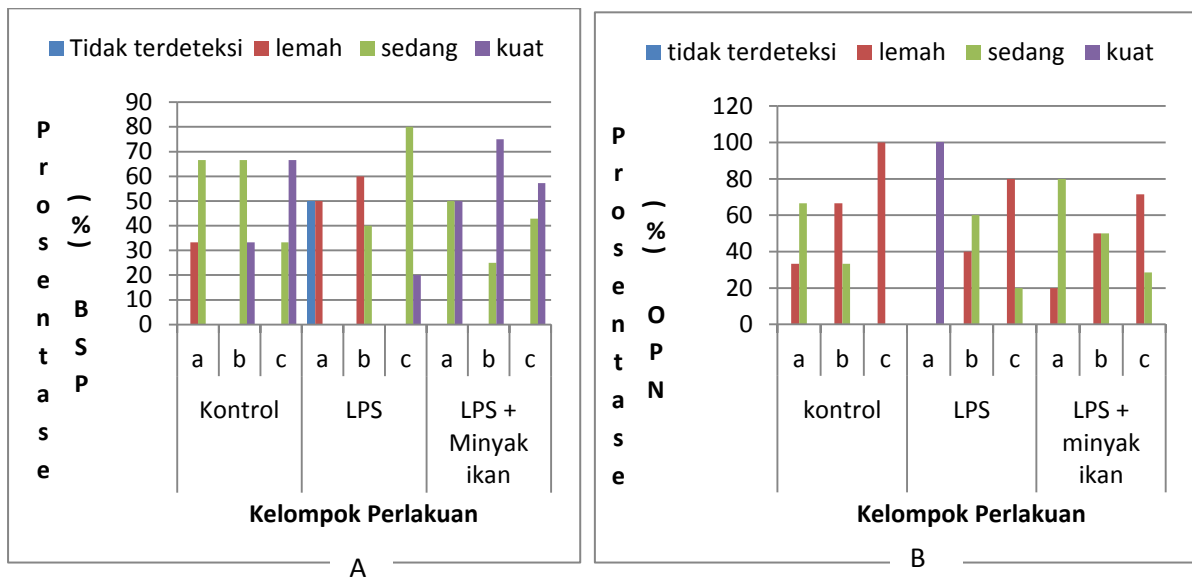
Gambar 1. Jumlah Osteoblas dan Osteoklas  
Keterangan Gambar : a. 13 hari, b. 17 hari, c. 21 hari



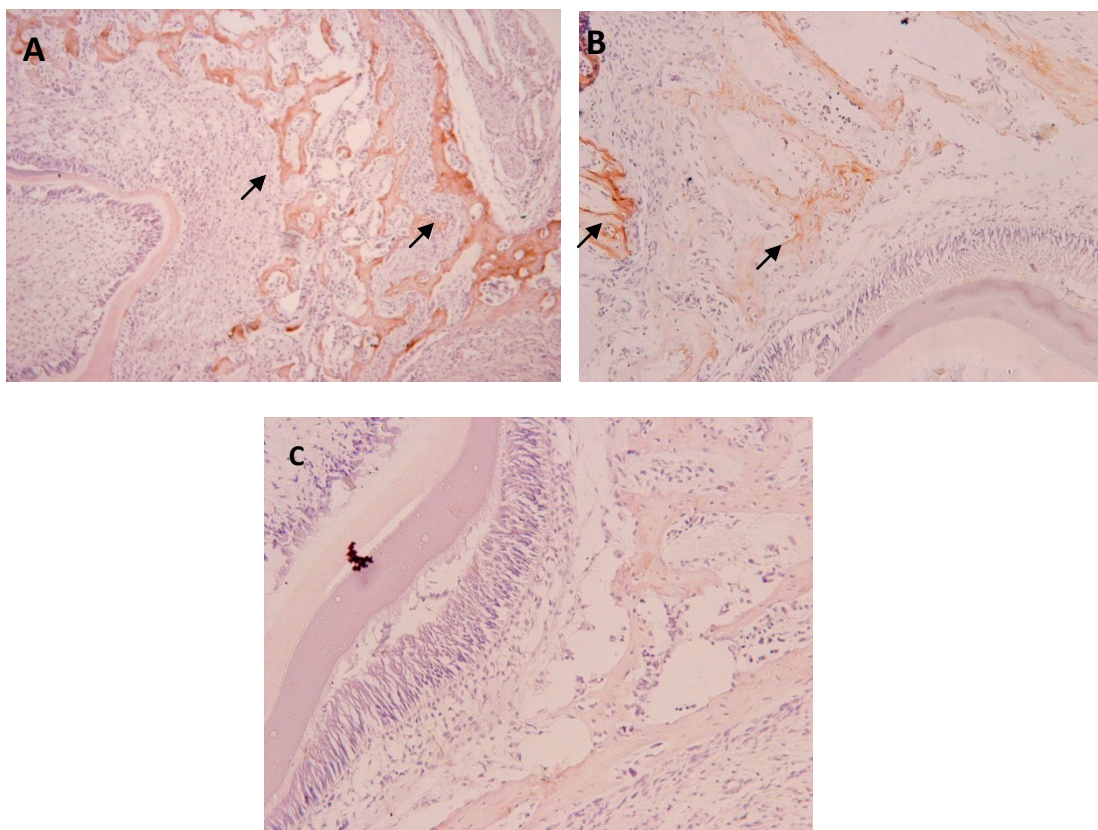
Gambar 2. Osteoblas dan osteoklas  
Keterangan gambar : A. tikus yang diinjeksi dengan LPS dan diberi minyak ikan, B. tikus yang hanya diinjeksi dengan LPS.

Pada pemeriksaan imunohistokimia, secara bermakna ( $p < 0,05$ ) ekspresi osteopontin terlihat lebih tinggi dibandingkan BSP pada tikus yang diinjeksi LPS di seluruh kelompok umur. Tikus dengan injeksi LPS dan diberi minyak ikan, menunjukkan jumlah osteoklas lebih rendah dibandingkan osteoblas, akan tetapi secara bermakna ( $p < 0,05$ ), BSP nampak lebih tinggi dibandingkan OPN. Hasil tersebut tidak berbeda bermakna dengan kelompok control. Begitu juga dengan ekspresi OPNnya nampak lebih tinggi dibandingkan dengan BSP pada

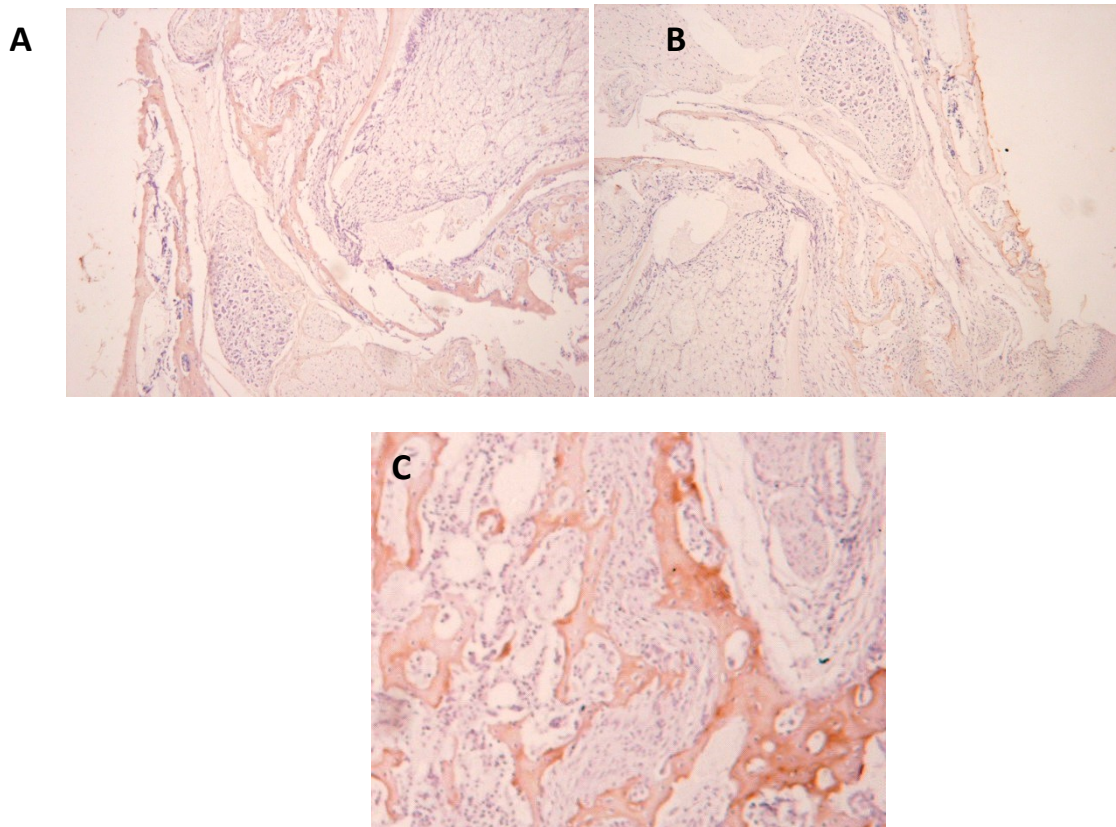
hari yang ke 13 setelah pemberian LPS. BSP terlihat meningkat secara bermakna pada tikus setelah hari ke 21 (gambar 3, 4 dan 5)



Gambar 3. Prosentase BSP (A), Prosentase OPN (B)  
Keterangan Gambar : a. 13 hari, b. 17 hari, c. 21 hari



Gambar 4. Ekspresi BSP (pembesaran 100x)  
Keterangan Gambar : Warna coklat menunjukkan BSP (+). A. tikus yang tidak mendapatkan perlakuan (control) skor 3, B tikus yang diinjeksi dengan LPS dan diberi minyak ikan skor 2, C. Tikus yang dilakukan injeksi LPS skor 1.



Gambar 5: Ekspresi OPN (pembesaran 100x)

Keterangan gambar : Warna coklat menunjukkan ekspresi OPN yang positif, A. Ekspresi OPN pada kontrol, nampak warna coklat tipis (skor 1); B.; Ekspresi OPN pada tikus yang diinduksi LPS disertai pemberian minyak ikan, menunjukkan warna coklat tipis (skor 1); C. Ekspresi OPN pada tikus yang diinduksi dengan LPS, terlihat warna coklat tebal (skor 3).

## PEMBAHASAN

Resorpsi tulang dilakukan oleh osteoklas. Osteoklas merupakan sel multinukleus yang dibentuk oleh fusi progenitor *mononuclear* dari monosit-makrofag *lineage*. Osteoblas dalam periosteum dan sel stromal yang menyerupai osteoblas (*osteoblast-like*) dalam jaringan hematopoetik mengontrol pembentukan dan aktivasi osteoklas melalui kontak sel ke sel dengan sel progenitor.<sup>(22)</sup> Diferensiasi prekursor osteoklas menjadi osteoklas multinuklear yang matur dan fungsi osteoklas diatur secara lokal oleh sitokin dan mediator inflamatori dan secara sistemik oleh hormonal.<sup>(23,24)</sup> Lipopolisakarida merupakan salahsatu faktor lokal yang mampu menyebabkan peningkatan jumlah dan aktivitas osteoklas. Lipopolisakarida merupakan struktur utama dinding sel bakteri Gram negatif yang berfungsi untuk integritas



struktur bakteri dan melindungi bakteri dari sistem pertahanan imun *host*. LPS bersifat endotoksin karena LPS mengikat reseptor CD14.<sup>(25)</sup> CD14 merupakan reseptor permukaan sel pada makrofag dan monosit untuk karbohidrat.<sup>(26,27)</sup> *Toll-like receptor-4* (TLR4) makrofag dan monosit yang berikatan dengan bakteri oleh karena adanya CD14 akan menginduksi sekresi sitokin dan *mediator lipid inflammation*.<sup>(25)</sup> Mediator tersebut memacu terbentuknya osteoklas dari sel stromal/osteoblas melalui ikatan sel ke sel yaitu *Receptor activator for NF- $\kappa$  B ligand* (RANKL) dalam osteoblas dengan RANK *receptor* pada progenitor osteoklas. *Macrophag colony stimulating factors* (M-CSF), IL-1 dan RANKL akan menyebabkan prekursor osteoklas berdiferensiasi dan mengalami fusi kemudian aktif menjadi osteoklas multinuklear.<sup>(28)</sup> Oleh karena itu pada penelitian ini tikus yang diinjeksi dengan LPS menunjukkan adanya peningkatan osteoklas yang lebih tinggi dibandingkan tikus yang tidak dilakukan injeksi LPS.

Pada penelitian ini daerah yang mengalami peningkatan osteoklas, juga ditemukan terjadinya peningkatan ekspresi OPN yang tinggi dibandingkan BSP. Sesuai dengan penelitian Suzuki, dkk.,<sup>(29)</sup> dan Indahyani, dkk.,<sup>(30)</sup> menyatakan bahwa osteoklas akan mensekresi OPN untuk fungsi produksi dan aktivasinya. Menurut Denhardt, dkk.,<sup>(31)</sup> beberapa sitokin inflamatori yaitu IL-1, IL-6, TNF  $\alpha$  yang diproduksi oleh makrofag dalam merespon inflamasi akan menginduksi osteoblas untuk mensekresi OPN, begitu juga sel T dan sel NK. Dikatakan bahwa beberapa mediator inflamatori dan faktor pertumbuhan termasuk IL-1, TNF- $\alpha$  dan *platelet-derived growth factor* (PDGF), juga dapat menstimulasi transkripsi mRNA OPN melalui aktivitas protein kinase C.<sup>(32)</sup> Injeksi LPS yang memacu peningkatan mediator inflamatori yaitu IL-1 dan TNF- $\alpha$  berperan besar pada peningkatan OPN pada kelompok tikus yang diinjeksi LPS. Tingginya ekspresi OPN pada daerah yang osteoklasnya juga tinggi, menunjukkan bahwa OPN berfungsi penting pada proses resorpsi tulang.

Menurut Giachelli, dkk.,<sup>(33)</sup> dan Renkl, dkk.,<sup>(34)</sup> menyatakan bahwa, OPN diketahui dapat menstimulasi migrasi makrofag maupun sel dendritik di daerah inflamasi. Oleh karena itu pentingnya OPN di daerah resorpsi berperan untuk pergerakan sel ke daerah resorpsi. Sekuen Arg-Gly-Asp yang dimiliki OPN, digunakan untuk berikatan dengan sel, sehingga dikatakan sekuen Arg-Gly-Asp berfungsi untuk perlekatan sel.<sup>(7,8)</sup> Sekuen tripeptida tersebut dapat dikenali oleh integrin sel tulang yaitu  $\alpha_v\beta_3$ .<sup>(5,6)</sup> Oleh karena itu OPN diperkirakan sebagai motilitas sel dan adesi sel.<sup>(4)</sup> Dikatakan juga bahwa OPN berfungsi untuk menjangkar osteoklas pada matriks mineral tulang.<sup>(35)</sup> Pada jaringan periodontal yang mengalami perbaikan, OPN merupakan petanda awal pada regenerasi jaringan periodontal yang berhubungan dengan proliferasi dan migrasi sel osteogenik dan sel ligamen periodontal, karena OPN dalam tulang alveolar terdeteksi lebih awal dibandingkan BSP yaitu pada hari ke 1 sampai 3 setelah luka dan jumlahnya meningkat pada hari ke 3 sampai 7, sedangkan BSP banyak diekspresikan pada hari 14-28 setelah terjadi luka. Keadaan ini dapat dinyatakan bahwa BSP dinyatakan yang memulai proses mineralisasi pada pembentukan tulang sehingga ekspresinya terjadi setelah lama terjadinya luka.<sup>(36)</sup>

Induksi LPS mengakibatkan ekspresi BSP secara bermakna lebih rendah dari pada OPN. LPS menstimulasi peningkatan jumlah dan aktivitas osteoklas. LPS akan menstimulasi peningkatan RANKL osteoblas yang berfungsi untuk pembentukan osteoklas, sedangkan BSP diekspresikan hanya terbatas oleh sel osteogenesis yaitu osteoblas dan kondrosit yang secara khusus terdistribusi secara lokal pada pembentukan tulang. Sekresi BSP dilakukan oleh osteoblas pada tahap diferensiasi, dan sedikit pada tahap aktif<sup>(37,38,39)</sup> sehingga BSP banyak disekresi oleh osteoblas yang berbentuk kuboid.<sup>(40)</sup> BSP disekresi oleh osteoblas pada tahap akhir diferensiasi sebagai media perlekatan sel, sehingga disebut sebagai marker diferensiasi osteoblas<sup>(41)</sup> dan juga oleh osteoblas yang matur serta kondrosit.<sup>(42)</sup> Zhu, dkk.<sup>(40)</sup> mengatakan bahwa sintesis BSP terjadi selama pembentukan tulang, khususnya

diekspresikan pada awal diferensiasi osteoblas, dan distribusinya dikaitkan dengan adanya pembentukan kristal HA.<sup>(38)</sup> Oleh karena itu ekspresi BSP secara bermakna lebih tinggi pada akhir terjadinya inflamasi, karena mulai terjadinya proses reparative yang dilakukan oleh osteoblas dan mulai terjadi proses aposisi, yang melibatkan osteoblas untuk mensekresi BSP sebagai tanda adanya proses mineralisasi.

Selama ini telah diketahui bahwa minyak ikan berpengaruh dalam menurunkan jumlah dan aktivitas osteoklas maupun preosteoklas.<sup>(14)</sup> Konsumsi minyak ikan mengakibatkan terjadinya peningkatan komposisi EPA dan DHA dan rendahnya AA dalam membran sel. Dinyatakan oleh Kew, dkk.<sup>(43)</sup> bahwa konsumsi EPA dan DHA pada kondisi sehat, tidak mempunyai efek yang bermakna pada penurunan fagositosis monosit dan netrofil ataupun pada sekresi proinflamatori dan molekul adhesi pada sel mononuklear darah perifer, walaupun komposisi fosfolipid plasma dan netrofil menurun. Menurut Montzioris, dkk.<sup>(44)</sup> bahwa konsumsi n-3 PUFA, selama 2 minggu mengakibatkan peningkatan *α-linolenic acid* (ALA) sebanyak 3-4 x lipat, EPA 3 x lipat, DHA 1,5 x lipat dan terjadi penurunan *linoleic acid* 8% sedangkan AA 7% dari data awal. Kandungan EPA dan DHA yang semakin tinggi pada membran fosfolipida, mengakibatkan penurunan pembentukan reseptor yang berfungsi pada pembentukan osteoklas, sehingga terjadi penghambatan pembentukan dan aktivitas osteoklas. Oleh karena itu pada penelitian ini nampak bahwa jumlah osteoklas semakin rendah pada kelompok tikus yang berumur 17 dan 21 hari.

Minyak ikan mempunyai efek bermakna terhadap penurunan ekspresi OPN pada tikus yang diinduksi dengan LPS. Rendahnya ekspresi OPN pada tikus yang diberi minyak ikan diakibatkan rendahnya produksi osteoklas, karena pemberian minyak ikan menurunkan sitokin proinflamatori maupun PGE<sub>2</sub> sehingga jumlah maupun aktivitas osteoklas tidak setinggi pada tikus yang hanya diinduksi LPS. Penurunan sitokin ini dihubungkan dengan penurunan aktivitas *intercellular adhesion molecule* (APC), yaitu dengan berkurangnya

ekspresi molekul *major histocompatibility* (MHC) klas II dan *intercellular adhesion molecule* (ICAM).<sup>(45)</sup> Ekspresi MHC klas II merupakan salah satu syarat untuk fungsi APC dan ICAM merupakan molekul reseptor pada APC yaitu makrofag.<sup>(46)</sup> Selain itu EPA dan DHA mengakibatkan penurunan PGE<sub>2</sub>, oleh karena perubahan EPA dan DHA dalam membran sel menyebabkan terjadinya peningkatan PGE<sub>3</sub> yang bersifat antiinflamatori. Rendahnya mediator inflamatori, menyebabkan pembentukan osteoklas juga rendah. Hal tersebut berperan penting pada penurunan ekspresi OPN, karena osteoklas dan mediator inflamatori berperan besar pada sekresi OPN. Ekspresi OPN semakin menurun dengan bertambahnya umur tikus yaitu pada 13, 17 dan 21 hari. Hal ini disebabkan konsentrasi EPA dan DHA semakin tinggi, karena pemberian n-3 PUFA selama 2 minggu mampu meningkatkan 1-3 x lipat EPA dan DHA pada membran sel. Penelitian ini sesuai dengan penelitian Indahyani, dkk.<sup>(13)</sup> bahwa jumlah dan aktivitas osteoklas akan semakin menurun dengan adanya pemberian minyak ikan dengan dosis yang semakin tinggi.

Minyak ikan menyebabkan peningkatan ekspresi BSP walaupun tidak berbeda bermakna dengan kontrol. Kandungan n-3 PUFA dalam minyak ikan, terbukti mencegah terjadinya resorpsi tulang, dengan terjadinya penurunan jumlah dan aktivitas osteoklas. Komposisi EPA dan DHA yang meningkat pada membran fosfolipida, mengakibatkan sintesis PGE<sub>3</sub> dan LTB<sub>4</sub> yang mempunyai sifat antiinflamatori juga meningkat.<sup>(47)</sup> Oleh karena bersifat antiinflamatori, monosit/makrofag *lineage* yang banyak terbentuk pada waktu proses erupsi akan berdiferensiasi menjadi osteoblas yang berperan penting pada proses mineralisasi. Osteoblas tersebut akan mengekspresikan BSP dalam jumlah tinggi. Penurunan sitokin proinflamatori maupun eikosanoid menyebabkan prekursor osteoblas melakukan proliferasi dan diferensiasi untuk menjadi osteoblas yang matur, sehingga osteoklas akan menurun dan osteoblas akan meningkat. Osteoblas yang matur akan aktif mensekresi komponen matriks ekstra selular termasuk BSP. BSP hanya disekresi oleh osteoblas, yang

berfungsi untuk inisiasi dan nukleasi HA yang menyebabkan proses aposisi di daerah resorpsi sehingga terjadi mineralisasi tulang.

Disimpulkan bahwa minyak ikan mampu meregulasi ekspresi OPN dan BSP. Hal tersebut sangat dipengaruhi adanya peningkatan jumlah osteoklas dan osteoblas. Osteoklas nampak berperan penting terhadap ekspresi OPN, sedangkan osteoblas berperan penting terhadap ekspresi BSP. OPN dan BSP tersebut penting untuk motilitas, penjangkaran atau perlekatan sel osteoblas dan juga osteoklas sehingga dikatakan bahwa sialoprotein tersebut mampu meningkatkan fungsi sel osteogenik.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Disampaikan ucapan terimakasih kepada *Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD, The University of Iowa, Departement of Biological Sciences, Iowa City, IA 52242*, yang telah memberikan bantuan monoclonal antibody OPN dan BSP dan pihak-pihak yang membantu penyelesaian penulisan paper ini

### TINJAUAN PUSTAKA

1. Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM., 2000, The cell biology of osteoclast function, *J. of Cell Sci.*, 113:377-381.
2. Fohr, B., Dunstan, CR., Seibel, MJ., 2003, Marker of Bone Remodeling in Metastatic Bone Diseases, *J Clin Endocrinol Metab.*, 88: 5059-5075
3. 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
4. Salih, E., Wang, J., Mah, J., Fluckiger, R., 2002, Natural Variation in The Extent of Phosphorylation of Bone Phosphoproteins as a Function of In-vivo New Bone Formation Induced by Demineralized Bone Matrix in Soft Tissue and Bony Environments, *Biochem J.*, 364:465-474
5. Ross, FP., Chappel, J., Alvarez, JL., 1993, Interactions Between the Bone Matrix Proteins Osteopontin and Bone Sialoprotein and the Osteoclast Integrin  $\alpha 5\beta 3$  Potentiate Bone Resorption, *J Biol Chem.*, 268:9901-9907
6. Hunter, GK., Hauschka, PV., Poole, AR., Rosenberg, LC., Goldberg, HA., 1996, Nucleation and Inhibition of Hydrxyapatite Formation by Mineralized Tissue Proteins, *Biochem J.*, 317:59-64.
7. Oldberg A., Franzen, A., Heinegard, D., 1988, The Structure of a Cell-Binding Bone Sialoprotein, *J Biol Chem.*, 263 (36): 1940-19432
8. Prince, CW., Oosawa, T., Butler, WT., Tomana, M., Bhowan, AS., Bhowan, M., Schrohenloher, RE., 1987, Isolation, Characterization and Biosynthesis of Phosphorylated Glycoprotein From Rat Bone, *J Biol Chem.*, 262:2900-2907
9. 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
10. 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

11. 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 Compartments and Biomarkers of Bone Formation in Rats, *J Nutr.*, 130:2274-2284.
12. Meydani, SN., Endres, S., Woods, MM., Goldin, BR., Soo, C., Morrill-Labrode, A., Dinarello, CA., and Gorbach, SL., 1991, Oral (n-3) Fatty Acid Supplementation Suppresses Cytokine Production and Lymphocyte Proliferation: Comparison Between Young and Older Women, *J Nutr.*, 121: 547-555.
13. Indahyani, DE., Dewanti, IR., Setyowati, DI., 2001, Pengaruh Minyak Ikan terhadap Tingkat Resorpsi Tulang Periapikal Tikus, *Kump. Ceramah dan Poster Ilmiah*, FKG Univ. Jember : 284-290
14. 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
15. Iwami-Morimoto, Y., Yamaguchi, K., Tanne, K., 1999, Influence of Dietary n-3 Fatty Acid on Experimental Tooth Movement in Rats (abstract), *Anggle-Orthod.*, Aug, 69(4): 365-371
16. Schlemmer, C.K., Coetzer, H., Claassen, N., Kruger, MC., 1999, Oestrogen and Essential Fatty Acid Supplementation Corrects Bone Loss Due to Ovariectomy in The Female Spraque Dawley Rat, *Prostaglandins, Leukot and Essent Fatty Acids*, 61(6): 381-390
17. 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
18. 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
19. 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
20. Peck, MD., 1994, Interaction of Lipids with Immune Function I : Biochemical Affects of Dietary Lipids on Plasma Membranes, *J Nutr Biochem.*, 5: 466-478
21. Garcia, JM., Martins, MD., Jaeger, RG., Marques, MM., 2003, Immunolocalization of Bone Extra Cellular Matrix Proteins (Type I Collagen, Osteonectin and Bone Sialoprotein) in Human Dental Pulp and Cultured Pulp Cell. *Int Endod J*, 36: 404-410
22. 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
23. Zheng, MH., Papadimitriou JM., Nicholson GC., 1991, A Quantitative Cytochemical Investigation of Osteoclast and Multinucleate Giant Cells, *Histochem J.*, 23: 180-88
24. Baron, R., 2006, Anatomy and ultrastructure of bone histogenesis, growth and remodeling, [www.endotext.org/parathyroid/parathyroid1/chOISO2.html](http://www.endotext.org/parathyroid/parathyroid1/chOISO2.html), (diakses tanggal 25 Juni 2007)
25. Janeway, CA., Tarvers, P., Walport, M., Shlomchik, M., 2001, *Immuno Biology*. 5<sup>th</sup> Ed. New York: Garland Publishing : 67-68
26. 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
27. Ziegler-Heitbrock HWL., Ulevitch RJ., 1993, CD14: Cell surface receptor and differentiation Marker, *Immunol Today*, 14:121-5.

28. 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
29. Suzuki, K., Takeyama, S., Kikuchi, T., Yamada, S., Sodek, J., Shinoda, H., 2005, Osteoclast Responses to Lipopolisaccharide, Parathyroid Hormone and Biphosphonate in Neonatal Murine Calvarias Analyzed by Laser Scanning Confocal Microscopy, *J Histochem Cytochem.*, 53: 1525-1537
30. Indahyani, DE, Al- Supartinah, S., Utoro, T., Soesatyo, M.HNE, 2007, Pengaruh Induksi Lipopolisakarida (LPS) terhadap Osteopontin Tulang Alveolaris Pada Masa Erupsi Gigi, *IJD FKG-UI*, 14 (1): 2-7.
31. Yumoto K., Ishijima M., Rittling SR., Tsuji K., Tsuchiya Y., Kon S., Nifuji A., Uede T., Dendardt DT., Noda M., 2002, Osteopontin Deficiency Protects Joints Against Destruction in Anti-type II Collagen Antibody-induced Arthritis in Mice, *PNAS*, 99: 4556-61
32. Denhardt, DT., Noda, M., O'Regan, AW., Pavlin, D., Berman, JS., 2001, Osteopontin as a Means to Cope with Environmental Insults: Regulation of Inflammation, Tissue Remodeling, and Cell Survival. *J Clin Invest.*; 107(9): 1055-1061
33. Giachelli, CM., Lobardi, D., Johnson, RJ., Murry, CE., Almeida M., 1998, Evidence for Role of Osteopontin in Macrophage Infiltration in Response to Pathological Stimuli *in vivo*, *Am J Pathol.*, 152: 353-358
34. Renkl, AC., Wussler, J., Ahrens, T., Thoma, K., Kon, S., Uede, T., Martin, SF., Simon, JC., Weiss, JM., 2005, Osteopontin Functionally Activities Dendritic Cells and Induces Their Differentiation toward a Th1-Polarizing Phenotype, *Blood.*, 106(3): 946-955
35. Reinholt, FP., Hultenby, K., Oldberg, A., Heinegard, D., 1990, Osteopontin-a Possible Anchored of Osteoclast to Bone, *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 (12): 4473-4475
36. Lekic, P., Sodek, J., McCulloch, CAG., 1996, Relation of Cellular Proliferation to Expression of Osteopontin and Bone Sialoprotein in Regenerating Rat Periodontium, *Cell and Tissue Res.*, 285(3): 491-500
37. Ganss, B., Kim RH., Sodek J., 1999, Bone Sialoprotein, *Crit Rev Oral Biol Med*, 10:79-98
38. Nefussi, JR., Obuluf, M., Forest, N., 1997, Sequential Expression of Bone Matrix Proteins during Rat Calvarias Osteoblast Differentiation and Bone Nodule Formation *in vivo*, *J Histochem Cytochem.*, 45(4): 493-503
39. Bianco, P., Riminucci, M., Silvestrini, G., Bonucci, E., Termine, JD., Fisher, LW., Robey, PG., 1993, Localization of Bone Sialoprotein (BSP) to Golgi and Post-golgi Secretory Structures in Osteoblasts and to Discrete Sites in Early Bone Matrix, *J Histochem Cytochem.*, 41: 193-203.
40. Zhu, Jing-Xu, Sasano, Y., Takahashi, I., Mizoguchi, I., Kagayama, M., 2001, Temporal and spatial Gene Expression of Major Bone Extracellular Matrix Molecules During Embryonic Mandibular Osteogenesis in Rats, *Histochem J.*, 33(1): 25-35
41. Ecarot-Charrier, B., Bauchard, F., Delloye, C., 1989, Bone sialoprotein II Synthesized by Cultured Osteoblasts Contains Tyrosine Sulfate, *J Biol Chem.*, 264(33): 20049-20053
42. Roca, H., Phimphilai, M., Krishnan, RG., Xiao, G., Franceschi, RT., 2005, Cooperative Interactions Between RUNX2 and Homeodomain Protein-Binding Sites are Critical for the Osteoblast-Specific Expression of the Bone Sialoprotein Gene, *J Biol Chem.*, 280(35): 30845-30855
43. Kew, S., Mesa, MD., Tricon, S., Buckley R., Minihane, AM., Yaqoob, P., 2004, Effects of Fish Oils Rich in Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic acids on Immune Cell Composition and Fuction in Healthy Humans, *Am J Clin Nutr.*, 79: 674-681

44. Montzioris, E., Cleland, LG., Gibson, AR., Neumann, MA., Demasi, M., James, MJ., 2000, Biochemical Effects of a Diet Containing Foods Enriched With n-3 Fatty Acids., *Am J Clin Nutr.*, 72: 42-48
45. Hughes, DA., Southon, S., Pinder, AC., 1996, (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Modulate the Expression of Functionally Associated Molecule on Human Monocytes *in-vitro*, *J Nutr.*, 126:603-610
46. Seymour, GJ., Savage, NW., Walsh, LJ., 1995, *Immunology: An Introduction for The Health Sciences*, McGraw-Hill Book Co Australia Pty Limited, Australia
47. Calder, PC., 1998, Immunoregulatory and Anti Inflammatory Effects of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, *Braz J Med Biol Res.*, 31(4): 467-490.