

Kadar Piridinolin pada Saliva Wanita Usia Perimenopause (Pyridinoline Levels in Saliva of Female in Perimenopause Stage)

Rangga Diputra¹, Agustin Wulan Suci Dharmayanti², Desi Sandra Sari³

^{1,2,3}Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

e-mail korespondensi: rangga.diputra@me.com

Abstract

Perimenopause is a phase between Pre-menopausal and Post-menopausal. Perimenopause usually occurs at the age of 40. In the perimenopausal phase, women will experience a declination in bone density of approximately 5-15 % , which are caused by hormonal change, especially estrogen, which plays an important role enhancing the activity of osteogenesis . On bone resorption , osteoclasts secretes proteases, which play a roll of dissolving the organic matrix between the collagen and bone mineral. Collagen is the main component of connective tissue in the bone. Type I collagen is a protein that forms 90-95 per cent of most organic material of bone. Collagen, which is dissolved by osteoclasts will result in the degradation of one pyridinium crosslink, especially pyridinoline. Pyridinoline is bonding between collagen molecules, that contribute to stabilize and strengthen the overall structure of the collagen tissues, such as bone and cartilage. In the oral cavity, pyridinoline crosslink generally can be found in the gingival sulcus it contain as gingival crevicular fluids .gingival crevicular fluids also dissolved in saliva. Saliva collection is simple , non-invasive and does not endanger the operator and the patient, it becomes the main reason using of saliva . This study aimed to determine the differences in levels salivary pyridinoline of women whom in the age of perimenopause and still productive and to determine the relationship between the age and pyridinoline levels of them. The subjects, who were selected, namely women in 40-55 years and 30-35 years old. Oral examination conducted to determine the health of the oral cavity and periodontal tissue health. After the examination, subjects were instructed to collect her saliva to the saliva pot. Measurement of pyridinoline levels in saliva were measured using LC MS. Result: There were no significant differences between pyridinoline levels in women in perimenopausal age or in productive age, also there is no corelations between the age of women and the levels of pyridinoline.

keywords: perimenopause, pyridinoline, saliva

Abstrak

Fase perimenopause merupakan masa perubahan antara premenopause dan menopause. Fase perimenopause biasanya terjadi pada umur 40 tahun. Pada fase perimenopause, wanita akan mengalami penurunan densitas tulang kurang lebih 5-15% yang disebabkan oleh perubahan hormonal terutama hormon estrogen. Dimana hormon estrogen memegang peran penting meningkatkan aktivitas osteogenesis. Pada resorpsi tulang, osteoklas berperan mensekresi protease yang dapat melarutkan kolagen diantara matriks organik dan mineral tulang yang bebas. Kolagen merupakan komponen utama sebagian jaringan ikat pada tulang. Kolagen tipe I merupakan protein terbanyak yang membentuk 90-95 persen materi organik tulang. Kolagen yang dilarutkan oleh osteoklas akan menghasilkan degradasi ikatan piridinium salah satunya piridinolin, Piridinolin adalah ikatan antar molekul kolagen yang berkontribusi dalam menstabilkan dan memperkuat keseluruhan struktur jaringan kolagen seperti tulang dan kartilago. Ikatan piridinolin di rongga mulut pada umumnya dapat ditemukan di sulkus gingiva dalam cairan krevikular ginggiva. Cairan krevikular ginggiva juga terlarut dalam saliva. Pengumpulan saliva yang simpel dan non invasif, serta tidak membahayakan operator dan pasien menjadi alasan utama penggunaan saliva. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan kadar piridinolin pada saliva wanita usia perimenopause dengan usia produktif dan untuk mengetahui hubungan usia dengan kadar deoksipiridinolin. Subyek yang dipilih yaitu wanita usia 40-55 tahun dan usia 30-35 tahun. Pemeriksaan rongga mulut dilakukan untuk mengetahui tentang kesehatan rongga mulut dan kesehatan jaringan periodontal. Setelah dilakukan pemeriksaan, subyek diinstruksikan untuk mengumpulkan salivanya ke dalam pot obat. Pengukuran kadar piridinolin pada saliva diukur menggunakan LC MS. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara kadar piridinolin pada wanita usia perimenopause dengan usia produktif dan tidak ada hubungan antara usia dengan kadar piridinolin

Kata kunci: piridinolin, perimenopause, saliva

Pendahuluan

Wanita merupakan sosok unik, karena wanita akan mengalami fase yang akan mempengaruhi perubahan fisiologis dan psikologis. Fase tersebut dimulai dari fase premenstruasi sampai dengan menopause. Fase ini akan dialami semua wanita dan dapat mempengaruhi kualitas hidup seorang wanita, terutama fase perimenopause [1].

Fase perimenopause merupakan masa perubahan antara premenopause dan menopause. Pada masa ini terjadi perubahan-perubahan kadar hormon reproduksi yang dapat menyebabkan berbagai perubahan psikis dan fisiologis. Keadaan ini sebenarnya bukan suatu keadaan patologis, melainkan suatu proses yang menjadi bagian dalam perjalanan hidup wanita. Walaupun demikian, beberapa wanita dapat merasa terganggu akan perubahan psikis dan fisiologis yang terjadi, sehingga membutuhkan suatu penanganan khusus dalam bidang medis [1].

Fase perimenopause merupakan fase terbaik dalam mengevaluasi resiko kesehatan wanita, selain itu fase perimenopause merupakan fase adaptasi untuk menghadapi fase menopause dan menetapkan pencegahan yang diperlukan[2]. Perubahan pola haid merupakan gejala umum dari fase perimenopause. Menurut Zulkarnaen (2003) lebih dari 90% wanita perimenopause akan mengalami perubahan pola haid. Fase perimenopause biasanya terjadi pada umur 40 tahun, tetapi hal itu bervariasi pada setiap wanita [3].

Pada fase perimenopause, wanita akan mengalami penurunan densitas tulang kurang lebih 5-15% [4]. Perubahan ini disebabkan oleh perubahan hormonal terutama hormon estrogen. Hormon estrogen memegang peran penting meningkatkan aktivitas osteogenesis. Penurunan hormon estrogen berpengaruh pada aktifitas osteoblast dan osteoklas dalam proses resorpsi dan remodeling tulang[5, 6]. Resorpsi pada bidang kedokteran gigi dapat menyebabkan prosedur klinis menjadi lebih sulit, khususnya pada bidang prostetik dan perawatan gigi restoratif.

Pada resorpsi tulang, osteoklas berperan mensekresi protease yang dapat melarutkan kolagen diantara matriks organik dan mineral tulang yang bebas[7]. Kolagen merupakan komponen utama sebagian jaringan ikat pada tulang. Kolagen tipe I merupakan protein terbanyak yang membentuk 90-95 persen materi organik tulang [8].

Serat kolagen tipe I diikat oleh ikatan piridinium yang terdiri dari piridinolin, dan deoksipiridinolin[9]. Kolagen yang dilarutkan oleh osteoklas akan menghasilkan degradasi ikatan piridinium dimana piridinolin dan deoksipiridinolin

juga ikut terdegradasi [7].

Piridinolin adalah ikatan trifungsional 3-hidroksipiridinium antar molekul kolagen yang berkontribusi dalam menstabilkan dan memperkuat keseluruhan struktur jaringan kolagen seperti tulang dan kartilago [10]. Piridinolin berperan sebagai ikatan matur yang terdapat pada sebagian besar jaringan ikat [11].

Dalam proses degradasi tulang yang dilakukan oleh osteoklas, piridinolin masih terikat dalam fragmen-fragmen hasil degradasi tersebut. Piridinolin juga tidak terpengaruh pada degradasi fibril kolagen yang baru atau belum matur [11]. Letak piridinolin yang sebagian besar terdapat pada tulang dan kartilago membuat piridinolin menjadi salah satu penanda dalam metabolisme tulang dan memprediksi perubahan kepadatan mineral tulang [12].

Ikatan piridinolin di rongga mulut pada umumnya dapat ditemukan di sulkus gingiva dalam cairan krevikular gingiva. Selain di gingiva, produk dari piridinolin juga dapat ditemukan pada cairan biologis seperti saliva [13]. Kadar piridinolin pada saliva juga telah digunakan untuk mendiagnosis dan mengevaluasi penyakit pada tulang salah satunya osteoporosis[14, 15].

Saliva sebagai bahan diagnostik dianggap lebih menguntungkan dibandingkan penggunaan bahan lain. Pengumpulan saliva yang simpel dan non invasif, serta tidak membahayakan operator dan pasien menjadi alasan utama penggunaan saliva [16]. Penelitian menggunakan sampel cairan tubuh yang meliputi urin, serum dan GCF telah menunjukkan kadar piridinolin khususnya piridinolin dalam beberapa penyakit osteolitik [13, 17, 18].

Saat ini belum banyak penelitian tentang kadar piridinolin dalam saliva wanita usia perimenopause. Penggunaan saliva dalam menentukan kadar piridinolin sebagai penentuan resorpsi tulang dapat menjadi alternatif teknik dalam menentukan kadar piridinolin.

Metode Penelitian

Tahap persiapan dimulai dengan pembuatan *ethical clearance* dari komisi etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada. Dilanjutkan dengan pemilihan subyek penelitian dengan pemberian kuesioner yang berkaitan dengan kriteria subyek penelitian. Selanjutnya subyek penelitian diberi penjelasan mengenai maksud dan tujuan penelitian ini dan subyek mengisi dan menyetujui *informed consent*.

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian observasional analitik dengan pendekatan *case control*. Subyek penelitian yang dipilih yaitu

wanita usia perimenopause 40-55 tahun dan sebagai kontrol dipilih wanita usia produktif 30-35 tahun. Kriteria subyek penelitian adalah tidak memiliki kebiasaan merokok dan minum alkohol, tidak menggunakan obat-obatan terapi hormon, tidak sedang hamil dan menstruasi, tidak memiliki penyakit sistemik, skor indeks periodontal 0,5-2,0, dan jika memiliki karies maksimal dengan skor ICDAS 2.

Setelah subyek penelitian dipilih, dilakukan pengambilan sampel saliva. Subyek diinstruksikan menutup mulut untuk menunggu saliva terkumpul di rongga mulut. Selanjutnya, subjek diinstruksikan untuk mengeluarkan saliva pada wadah saliva (pot obat) yang telah disediakan dan ditutup. Alat penampung saliva dimasukkan dalam *ice box* dan disimpan dalam *deep freezer -30°C*.

Pemeriksaan kadar deoksipiridinolin dilakukan dengan menggunakan Liquid Chromatograph-tendem Mass Spectrometry (LC MS). Persiapan pada LS-MS/MS dimulai dengan Pengaturan suhu pada autoinjeksi diatur pada suhu 10°C. *Ultra High Liquid Chromatography* diatur pada isocratic, dengan komposisi 30% *acetonitrile*, 0,1% *formic acid*, dan 70% H₂O. Kecepatan diatur pada 300µL/menit. Kolom yang digunakan jenis *Hypersil Gold*. Ukuran panjang kolom ini adalah 10 cm. Suhu pada kolom dijaga sebesar 40°C.

MS/MS *triple quadrupole* diatur dengan *scan* tipe SIM (*Selected Ion Monitoring*) dengan *scan time* 0,050 detik dan luas 0,010 m/z. Pengaturan Q1MS dengan *center mass* 429.2 m/z. Ionisasi dengan menggunakan HESI dengan kondisi *spray voltage* sebesar 3200V, *vaporizer temperature* sebesar 250°C, *sheath gas pressure* sebesar 45, *aux gas pressure* sebesar 15, dan suhu kapiler sebesar 200°C

Persiapan standar dengan standar Kalibrator piridinolin dengan konsentrasi 6,20 ppm. Larutan standar (A) diambil sebanyak 50µL lalu diencerkan menjadi 1mL setara dengan 311 ng/mL. Larutan standar (B) diambil sebanyak 75 µL diencerkan menjadi 1 mL setara dengan 311 ng/mL. Standard diinjeksikan dengan volume injeksi mulai dari 1 µL sampai dengan 12 µL.

Preparasi sampel dimulai dengan pengambilan sampel. Sampel diambil sebanyak 50 µL diencerkan menjadi 1 mL. Larutan tersebut disaring dengan menggunakan *filter nylon* 0,2 µM. Sampel dianalisis dengan LC MS/MS dengan volume injeksi 0,1 µL sampai dengan 10 µL.

Pengukuran kadar piridinolin larutan sampel diambil sebanyak 50 µL diencerkan menjadi 1 mL. Larutan tersebut disaring dengan menggunakan *filter nylon* 0,2µM. Penyaringan dengan *filter nylon* ini berfungsi untuk memisahkan senyawa-senyawa yang

tidak digunakan dalam penelitian dan menyaring pengotor yang dapat mengganggu deteksi senyawa dalam LC MS. Sampel ditempatkan pada auto injeksi.

HPLC terdiri dari 2 fase, fase gerak dan fase diam. Fase gerak diisi dengan 30% *acetonitrile*, 0,1% *formic acid*, dan 70% H₂O. Fase diam menggunakan kolom jenis *Hypersil Gold*.

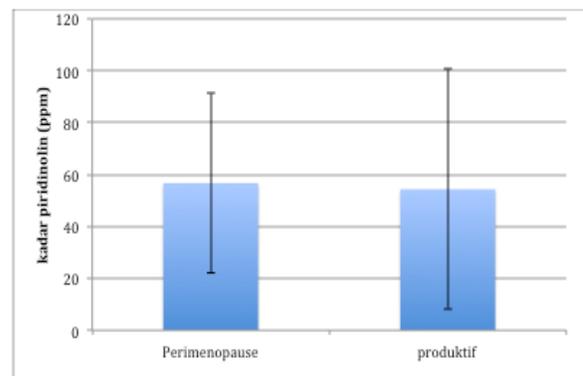
Larutan disiapkan dan disimpan dalam reservoir, kemudian fase gerak akan digerakkan oleh pompa masuk kedalam pipa-pipa yang akan melewati tempat injeksi sampel. Sampel kemudian dianalisis dengan LC-MS/MS dengan volume auto injeksi 0,1 µL sampai dengan 10 µL. Sampel akan masuk kedalam aliran fase gerak selanjutnya menuju kolom. Di dalam kolom LC MS senyawa akan dipisahkan. Senyawa yang dipisahkan kemudian di tembak ion (-) hingga senyawa menjadi pecah dan bermuatan positif. Senyawa bermuatan akan dibelokkan oleh magnet dan terpisahkan sesuai dengan berat molekul masing-masing. Senyawa yang telah tersortir masuk ke ruang analisis dan kadar akan terlihat pada computer dalam bentuk kromatogram. Menggunakan software LC Quan kurva tersebut dapat diubah menjadi satuan ppm.

Hasil Penelitian

Gambar 1. Diagram Rata-rata Kadar Piridinolin

Pada penelitian diatas dapat disebutkan bahwa kadar piridinolin tertinggi terdapat pada subjek penelitian dengan usia perimenopause dengan rata-rata sebesar 56,70. Perbedaan terlihat bila dibandingkan dengan subjek penelitian dengan usia produktif yaitu dengan rata rata sebesar 54,37.

Berdasarkan data dari penelitian ini selanjutnya dilakukan analisis data yang diawali dengan uji normalitas data menggunakan *Klomagorov-Smirnov Test*. Hasil uji *Kolmogorov-Smirnov* didapatkan nilai signifikansi 0.949 ($p > 0,05$)



sehingga data dinyatakan normal. Uji homogenitas

menggunakan uji *Levene*. Hasil uji *Levene* didapatkan nilai signifikansi 0,251 ($p > 0,05$) sehingga data dinyatakan homogen. Data berdistribusi normal dan homogen sehingga dilanjutkan dengan uji parametrik *Independent T-test*. Hasil uji *Independent T-test* didapatkan nilai signifikansi 0,931 ($p > 0,05$) sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan yang tidak signifikan pada setiap kelompok.

Hasil uji korelasi menggunakan *pearson correlation* menunjukkan nilai signifikansi sebesar $r = 0,12$, artinya tidak ada korelasi antara usia dengan kadar piridinolin.

Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat kadar piridinolin pada saliva wanita usia perimenopause. Jika dibandingkan dengan usia produktif, maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar piridinolin usia perimenopause dan usia produktif. Meskipun demikian, kadar piridinolin pada saliva wanita usia perimenopause memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan kadar piridinolin pada saliva wanita usia produktif.

Perbedaan usia yang diambil merupakan faktor utama yang menyebabkan adanya perbedaan kadar piridinolin pada saliva masing-masing kelompok. Usia berkaitan dengan proses remodeling tulang. Diketahui pada usia anak dan remaja lebih banyak terjadi pembentukan tulang dibandingkan dengan resorpsi tulang. Proses pembentukan tulang ini akan terus berlanjut hingga sekitar usia 24 tahun [19].

Setelah memasuki umur 24 tahun, proses pembentukan tulang dan pertumbuhan tulang mulai melambat. Proses remodeling tulang sebagai proses resorpsi dan aposisi akan dimulai. Semakin lanjut usia, proses remodeling semakin tidak seimbang dimana proses resorpsi lebih tinggi dibandingkan dengan proses aposisi [19].

Proses remodeling tulang melibatkan beberapa hormon. Salah satu hormon yang terpenting adalah hormon estrogen. Hormon ini berfungsi dalam pemeliharaan kesehatan tulang dan juga meningkatkan proses osteogenesis yaitu pengaktifan osteoblast dan osteoklas [6].

Pada usia produktif, hormon estrogen masih bekerja secara seimbang, sehingga aktivitas osteoblast dan osteoklas pada proses remodeling tulang akan berjalan seimbang. Ketika memasuki usia perimenopause, kadar hormon estrogen sudah mulai mengalami penurunan yang diakibatkan oleh menurunnya fungsi ovarium. Hal ini mengakibatkan aktivitas osteoblast dan osteoklas tidak seimbang, sehingga resorpsi akan lebih banyak terjadi

dibandingkan dengan aposisi [19].

Berdasarkan uji *Independent T-test* perbandingan kadar piridinolin pada saliva wanita usia perimenopause dengan wanita usia produktif menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan. Hasil uji korelasi juga menunjukkan hasil yang tidak signifikan terhadap umur dan kadar piridinolin. Perbedaan yang tidak signifikan ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu faktor endogen dan faktor eksogen.

Faktor usia merupakan salah satu yang mempengaruhi hasil penelitian ini tidak signifikan. Tingginya sekresi piridinolin wanita usia produktif diketahui akan terjadi pada usia 20-29 tahun sedangkan pada wanita usia menopause sekresi tertinggi piridinolin terjadi pada usia 50 tahun dimana pada usia tersebut wanita telah memasuki masa senium dan telah mendapatkan keseimbangan baru pada kadar estrogen [12].

Pada penelitian lain disebutkan pada wanita dengan rentang usia 30-50 tahun tidak terdapat perbedaan signifikan pada kadar piridinolin. Hal ini dapat disebabkan pada rentang usia tersebut wanita telah mengalami fase klimakterium dan akan terjadi perubahan kadar FSH dan LH. Perubahan kadar FSH dan LH ini berpengaruh pada naik dan turunnya kadar estrogen [20, 12]. Pemeriksaan kadar FSH yang merupakan salah satu tanda bahwa wanita telah memasuki masa perimenopause tidak dilakukan oleh peneliti, hal ini dimungkinkan berpengaruh pada hasil penelitian.

Aktivitas fisik yang berbeda-beda dari setiap subyek penelitian juga mempengaruhi perbedaan kadar piridinolin. Penelitian mengenai hubungan antara aktivitas fisik dengan kadar piridinolin menyebutkan peningkatan kadar piridinolin pada urin terlihat pada subyek penelitian dengan kondisi istirahat total selama 4 hari [12]. Hal tersebut dimungkinkan berkaitan dengan pembebanan dan aktivitas fisik pada tulang membuat proses *bone turnover* menurun.

Faktor lain yang mempengaruhi yaitu diet. Seseorang dengan konsumsi suplemen seperti vitamin D atau penambah kalsium memiliki efek yang sangat signifikan bagi kadar piridinolin pada urin [12]. Walaupun dalam penelitian telah dikontrol tentang obat-obatan yang digunakan, namun konsumsi makanan setiap subyek penelitian tidak dapat dilakukan pengontrolan.

Berdasarkan diskusi di atas, perlu dikaji kembali kadar piridinolin pada saliva sebagai suatu penanda aktivitas metabolisme tulang. Beberapa tahun belakangan terdapat berbagai macam penanda yang digunakan dalam mendeteksi metabolisme tulang seperti hidrosiprolin, hidroksilisin C terminal, dan N terminal. Penanda tersebut memiliki ikatan

erat dengan proses metabolisme tulang khususnya resorpsi tulang [11].

Beberapa diantaranya menggunakan saliva dan cairan krevikular gingiva pada daerah rongga mulut. Selain itu, produk degradasi kolagen seperti piridinolin, deokspiridinolin dan ICTP juga telah banyak diteliti sebagai penanda metabolisme tulang. Produk degradasi kolagen yang diakibatkan oleh aktivitas osteoklas selama ini dipercaya untuk merefleksikan keadaan tulang.

Kebanyakan peneliti menggunakan urin atau serum dalam mendeteksi penanda resorpsi tulang, tetapi seiring dengan perkembangan waktu, peneliti menggunakan sampel yang mudah untuk didapat, non invasif dan aman bagi operator serta pasien. Saliva merupakan salah satu sampel yang mulai digunakan, namun pada saliva terkandung berbagai macam produk-produk lain yang keluar melalui kelepasan saliva. Variabel lain yang dapat membuat bias harus dikontrol dengan penanganan yang tepat agar memberikan hasil yang maksimal [12,21].

Simpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar piridinolin pada saliva wanita usia perimenopause dengan saliva wanita usia produktif dan tidak terdapat hubungan antara usia dengan kadar piridinolin.

Saran dari penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kadar piridinolin pada saliva wanita usia perimenopause menggunakan teknik lain seperti ELISA, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kadar piridinolin pada saliva wanita usia perimenopause dengan rentang usia yang lain, seperti rentang usia produktif dan usia menopause dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh usia terhadap kadar piridinolin.

Daftar Pustaka

- [1] Liauw, Umar, Hendrianti, Idrus, Pinontoan, Widyahening, Adjie. Skoring Psikopatologi dan Faktor yang Berhubungan Pada Perempuan Usia Perimenopause. *Maj Kedokt Indon.* 2007; 57: 1-7.
- [2] Frackiewicz EJ, Cutler NR. Women's Health Care During the Perimenopause. *J. AM Pharm Assoc.* 2000; 40 (6).
- [3] Zulkarnaen Y. Gejala-gejala Wanita Perimenopause. Universitas Sriwijaya. Palembang. 2003; 3 Nopember 2003.
- [4] Yuliana, Wiryathini, Karmaya, Widarsa. Penurunan Osteoklas Epyfisis Tulang Radius Mencit Perimenopause dengan Pemberian Estrogen dan Berenang. *Jurnal Veteriner.* 2012; 13(4): 440-444.
- [5] Bell NH. RANK ligand and the regulation of skeletal remodelling. *J Clin Invest.* 2003; 1120-112.
- [6] Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen Receptor Alfa and Beta are Differentially Expressed in Developing Human Bone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolisme* 2001; 86(5):2309-2314.
- [7] Morawati S. Kadar β -Cross-Links Telo peptide pada Wanita Postmenopause dengan Osteoporosis atau Osteopoeni. *USU e-Repository.* 2009.
- [8] Murray RK, Granner DK, Rodwell V W. *Biokimia Harper.* Jakarta: EGC. 2009.
- [9] Taba M, Jr, Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* 2005; 49:551-571.
- [10] Tanimoto, Imada, Ohno, Sasako, Honda, Tanne. Association between Craniofacial growth and Urinary Bone Metabolic Markers (Pyridinoline, deoxypyridinoline) in growth rats. *J Dent Res.* 2003; 82 (1): 28-32
- [11] Chang DH. 2007. tumor marker research focus. New York : Nova Science publisher.
- [12] Vesper. Measurement of Pyridinoline and Deoxypyridinoline in Metabolic Bone Disease. *CLI.* 2005; 1-2.
- [13] Giannobile WV. C- Telo peptide Pyridinoline Cross-Links. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 878: 404-412.
- [14] Arican, Koylu, Uyaroglu, Erol, Çalim. Diagnostic Importance of Deoxypyridinoline and Osteocalcin in Equine Osteoarthritis. *Acta Vet Brno.* 2004;73: 491-496.
- [15] Maisey MN. Pyridinoline Cross-Links are Detectable in Human Saliva. *IADR.* 2005.
- [16] Chiappin, Antonelli, Gatti, Palo. Saliva specimen: A New Laboratory Tool for Diagnostic and Basic Investigation. *Clinica Chimica Acta.* 2007; 383: 30-

- 40.
- [17] Singer F, Eyre D. Using Biochemical Markers of Bone Turnover in Clinical Practice. *Cleveland Clinical Journal of Medicine*. 2008; 75(10): 739-750.
- [18] Dharmayanti AWS. Review: Pyridinoline Cross-link as Biomarker Alveolar Bone Destruction. *The Indonesian Journal of Dental Research*. 2010.
- [19] Emerk K. Bone Markers and Osteoporosis. *Jugoslov Med Biohem*. 2004; 23 (3): 221-228.
- [20] Prawiryoharjo S. Ilmu kandungan. Jakarta: Yayasan Bisa Pustaka. 1999.
- [21] Zia A, Khan S, Bey A, Gupta ND, Muktar US. Oral Biomarkers in the Diagnosis and Progresion of Periodontal Disease. *Biology and Medicine*. 2011; 3(2): 45- 52