

Pengaruh Perbedaan Lama Waktu *Distress* Kronis Terhadap Perubahan Jumlah Osteoblas pada Tulang Alveolar Tikus *Sprague Dawley*

(*The Effect of Differentiation Chronic Distress Duration of Osteoblast Cells Number in Alveolar Bone of Sprague-Dawley Rats Changing*)

Hayyu Rizky Nur Rahma, Suhartini
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
E-mail : hayyurizky@ymail.com

Abstract

Background: Stress is a phenomenon that can occur to all organisms. Pathological stress is called distress. Distress in the long term is called chronic distress. Chronic distress will increase the secretion of cortisol, which is inducing osteoblast apoptotic and reduce osteoblast number. **Purpose:** Analyzing the effect of differentiation chronic distress duration of osteoblast cells number in aveolar bone of Sprague dawley rats changing. **Methods:** Using Sprague Dawley rats with total sample of 24 animals. The rats were given an electric shock stressor (Electrical Foot Shock) as distress chronic for 7, 14, and 28 days. Stressors were given for 30 minutes at 9 a.m every day during the treatment period. The amount of electrical current is 2-8 mA, 48 V voltages and 0.5 Hz frequency. Osteoblast number were observed histologically using a microscope with 400x magnification. **Results:** The results showed a significant difference of 0.00 ($p < 0.05$) between variables. Significant differences were found in the SPF 0 with SPF 4. **Conclusion:** Differences long time proven chronic distress affects the decrease in the number of osteoblasts in alveolar bone Sprague Dawley rats.

Keywords: Alveolar bone, chronic distress, osteoblast, Sprague daw

Abstrak

Latar Belakang : Stres merupakan fenomena yang dapat mengenai semua organisme. Stres yang bersifat patologis disebut *distress*. *Distress* dalam jangka waktu lama disebut *distress* kronis. *Distress* kronis akan meningkatkan sekresi kortisol yang akan menginduksi apoptosis osteoblas dan mengurangi jumlah osteoblas. **Tujuan :** Menganalisa pengaruh perbedaan lama waktu *distress* kronis terhadap perubahan jumlah osteoblas pada tulang alveolar tikus *Sprague dawley*. **Metode Penelitian :** Menggunakan tikus *Sprague dawley* dengan total sampel 24 ekor. Tikus diberi stresor renjatan listrik (*Electrical Foot Shock*) yang menyebabkan *distress* kronis selama 7, 14, dan 28 hari. Stresor diberikan selama 30 menit setiap jam 9 pagi setiap hari selama masa perlakuan, dengan arus listrik sebesar 2-8 mA, tegangan 48 V dan frekuensi 0,5 Hz. Jumlah osteoblas diamati secara histologis menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. **Hasil :** Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan signifikan sebesar 0,049 ($p < 0,05$) antar variabel. Perbedaan signifikan terdapat pada SPF 0 dengan SPF 4. **Kesimpulan :** Perbedaan lama waktu *distress* kronis terbukti mempengaruhi penurunan jumlah osteoblas pada tulang alveolar tikus *Sprague dawley*.

Kata Kunci: distress kronis, osteoblas, *Sprague dawley*, tulang alveolar

Pendahuluan

Stres sampai saat ini masih menjadi permasalahan yang terus diteliti. Stres merupakan suatu fenomena yang dapat mengenai semua jenis organisme dan dapat mengganggu kondisi fisik serta kesehatan mental. Stres ringan yang berlangsung terus menerus disebut dengan stres kronis dan dapat berpengaruh buruk terhadap kesehatan [1].

Stres terdiri dari dua klasifikasi, yakni *eustress* dan *distress*. *Eustress* merupakan stres yang bersifat membangun, sedangkan *distress* merupakan stres yang bersifat patologis. Siklus *distress* dalam jangka waktu lama disebut *distress* kronis dan salah satu akibatnya akan mengenai seluruh sel di dalam tubuh salah satunya adalah sel osteoblas yang berada pada tulang alveolar. *Distress* kronis akan menimbulkan perubahan metabolisme sel yang mengarah pada kerusakan sel-sel, dan pada osteoblas *distress* kronis diduga menyebabkan apoptosis [2]-[3].

Stresor yang menyebabkan *distress* dapat berupa fisik maupun psikis. Apapun stresornya reaksi tubuh terhadap stresor adalah sama, yaitu ditandai dengan meningkatnya sekresi *corticotropic releasing factor* (CRF). CRF merupakan senyawa yang sekaligus berfungsi sebagai neurotransmitter dan sebagai hormon (neurohormon) [4].

CRF akan memasuki peredaran hipotalamus-hipofisis (suatu sistem peredaran darah vena yang menghubungkan hipotalamus-hipofisis). Melalui peredaran darah, CRF akan mencapai hipofisis dan pengikat CRF pada reseptor sel dalam hipofisis akan memicu sintesis protein *pro-opiomelanocortin* (POMC). Pengolahan pasca translasi POMC akan menghasilkan sejumlah polipeptida antara lain *adenocortical stimulating hormon* (ACTH). ACTH melalui peredaran darah akan mencapai kelenjar adrenal dan memicu sekresi hormon kortikosteroid oleh korteks adrenal [4].

Pengeluaran ACTH dari hipofisis anterior merangsang korteks adrenal untuk mengeluarkan kortisol [5]. Kortisol merupakan jenis hormon glukokortikoid. Paparan hormon kortisol yang terlalu lama pada osteoblas akan mengaktifkan *Glycogen Synthase Kinase 3 β* (GSK3 β) [6].

GSK3 β merupakan enzim kinase yang memiliki peran penting dalam proses apoptosis pada berbagai macam jenis sel. GSK3 β terdistribusi di dalam sitosol, mitokondria dan inti sel, dimana aktivasi dari enzim ini akan

menginduksi *Caspase-3* yang merupakan prekursor apoptosis suatu sel. Akibat terjadinya apoptosis maka menyebabkan pengurangan jumlah osteoblas [6].

Berdasarkan uraian di atas maka digunakan jenis stresor fisik, salah satu diantaranya adalah stresor rasa nyeri berupa renjatan listrik yang didapat dari *electrical foot shock* untuk menginduksi terjadinya *distress* kronis yang diduga menyebabkan penurunan jumlah osteoblas tulang alveolar. Beberapa alasan digunakan *electrical foot shock*, diantaranya penjalaran listrik pada spesimen cepat dan intensitas besaran dapat terukur dengan baik [7].

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *Post test Only Control Group Design* [8]. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2013-Maret 2014.

Sampel yang digunakan adalah tikus *Sprague dawley* dengan jumlah sampel sebanyak 24 ekor. Tikus dikelompokkan menjadi 4 kelompok, terdiri dari kelompok perlakuan hari ke 0 (SPF 0), kelompok perlakuan 7 hari (SPF 1), kelompok perlakuan 14 hari (SPF 2) dan kelompok perlakuan 28 hari (SPF 4).

Tahap perlakuan pada hewan coba dimulai dengan kelompok perlakuan SPF 1, SPF 2 dan SPF 4. Kelompok tersebut direnjat dengan alat *electrical foot shock* dengan kuat arus 2-8 mA, tegangan 48 Volt dan frekuensi 0,5 Hz selama 30 menit setiap hari [9]. Pada kelompok SPF 0, tikus tidak diberi perlakuan.

Pengorbanan tikus dilakukan pada hari ke 0, 7, 14 dan 28. Pengorbanan tikus dilakukan dengan cara inhalasi menggunakan kloroform untuk mempercepat kematian. Bagian tikus yang diambil adalah bagian rahang dari regio molar 1 sampai molar 3.

Setelah rahang terambil, maka tahap selanjutnya adalah preparasi jaringan. Pada tahap ini rahang dimasukkan ke dalam larutan fiksasi *buffer formalin* 10%, tujuannya untuk mencegah terjadinya proses autolisis, mempertahankan morfologi sel dan mencegah pertumbuhan bakteri dan jamur [10].

Setelah rahang difiksasi selama minimal 24 jam, tahap selanjutnya adalah tahap pembuatan sediaan. Dimulai dari proses dekalsifikasi menggunakan *Ethylenediamine tetraacetic acid*

(EDTA) 10% selama 24 jam sampai jaringan lunak dan mudah dipotong [11].

Jaringan disimpan dalam *cassete*. Tahap selanjutnya dilakukan dehidrasi, *clearing*, infiltrasi parafin (impregnasi), dan *embedding*, yaitu penanaman jaringan ke dalam parafin.

Jaringan dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 µm secara sagital sehingga tampak molar 1 hingga molar 3 dari sisi mesiodistal, kemudian diletakkan di atas permukaan air *waterbath* dengan temperatur 56°C-58°C hingga sayatan mekar. Potongan jaringan yang telah memenuhi kriteria yakni dengan bentuk mahkota, akar, dan tulang alveolar yang utuh diletakkan di atas *slide* preparat yang telah dilapisi polilisin sehari sebelumnya. Jaringan dikeringkan di atas *hotplate* dengan suhu 30°C-35°C minimal 12 jam, kemudian dilakukan pewarnaan *Haematoxyllin Eosin* (HE).

Tahap selanjutnya adalah tahap penghitungan jumlah osteoblas dengan menggunakan mikroskop binokuler perbesaran 400x. Setiap preparat masing-masing diamati 1 sediaan yang jaringannya sesuai dengan kriteria. Pengamatan dilakukan pada 3 lapang pandang, yaitu sepertiga servikal, sepertiga tengah dan sepertiga apikal bagian akar, oleh 3 pengamat.

Setiap preparat dari 1 orang pengamat didapatkan 3 data penghitungan jumlah osteoblas, kemudian dijumlahkan dan dirata-rata. Rata-rata yang didapat dari 1 orang pengamat dijumlahkan dengan rata-rata dari pengamat 2 dan 3, kemudian hasil penjumlahan tersebut dibagi 3, sehingga didapat rata-rata akhir dari 3 orang pengamat.

Data yang didapatkan kemudian dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Saphiro-wilk*. Langkah selanjutnya dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Analisis data selanjutnya yang digunakan apabila data berdistribusi normal dan homogen, yaitu menggunakan uji parametrik *one-way anova*, lalu dilanjutkan dengan uji *Least Significance Different* (LSD) [12].

Hasil Penelitian

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada bulan November 2013- Maret 2014 didapatkan jumlah osteoblas tertinggi pada kelompok SPF 0 dan jumlah osteoblas terendah pada kelompok SPF 4. Secara rinci, hasil penelitian dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 1. Rata-rata jumlah osteoblas pada tikus Sprague dawley pada kelompok perlakuan (SPF 0, SPF 1, SPF 2, SPF 4)

N	SPF 0	SPF 1	SPF 2	SPF 4
1	37.33	35.44	31.33	30.33
2	35.89	30.44	32	31.67
3	33.67	33	33.56	31.22
4	39.22	38.56	34.67	33.33
5	36.67	30.89	38.11	34.11
6	35.44	32.89	39.33	32.11
Mean	36.37	33.54	34.83	32.13
SD	1.71	2.77	2.97	1.26

Keterangan :

SPF 0 = kelompok perlakuan hari ke 0

SPF 1 = kelompok perlakuan 7 hari

SPF 2 = kelompok perlakuan 14 hari

SPF 4 = kelompok perlakuan 28 hari

Mean = Nilai rata-rata

SD = Standart Deviasi

N = Jumlah sampel

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa jumlah rata-rata osteoblas paling tinggi pada kelompok SPF 0, sedangkan jumlah osteoblas paling rendah ada pada kelompok SPF 4. Berdasarkan hasil tersebut dilanjutkan dengan tahap analisis data.

Hasil uji normalitas menggunakan uji *Saphiro-wilk*, didapatkan nilai signifikansi 0,139. Hasil tersebut menunjukkan data terdistribusi normal ($P > 0,05$). Hasil uji homogenitas menggunakan uji *Levene*, didapatkan nilai signifikansi (Sig.) 0,181 ($p > 0,05$), hasil tersebut menyatakan data homogen.

Hasil uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi 0,181 ($p < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan bermakna antar kelompok. Hasil uji *post hoc Least Significance Different* (LSD) terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok SPF 0 dengan kelompok SPF 4 (Sig.) 0,008 atau $p < 0,05$. Hasil analisa data di atas bisa dilihat pada tabel berikut.

Tabel 2. Uji *Shapiro-Wilk*, *Levene*, dan *One Way ANOVA*.

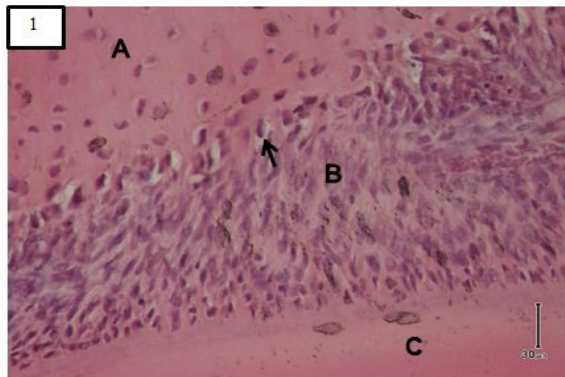
	Sig.
<i>Shapiro-Wilk</i>	.139
<i>Levene</i>	.181
<i>One Way ANOVA</i>	.049

Keterangan :
Sig : Signifikansi

Tabel 3. Hasil Uji LSD Jumlah Osteoblas			
		Mean Difference	Sig.
SPF 0	SPF 1	2.8333	0.065
	SPF 2	1.5367	0.302
	SPF 4	4,2417*	0.008
SPF 1	SPF 0	-2.8333	0.065
	SPF 2	-1.2967	0.382
	SPF 4	1.4083	0.343
SPF 2	SPF 0	-1.5367	0.302
	SPF 1	1.2967	0.382
	SPF 4	2.7050	0.077
SPF 4	SPF 0	-4,2417*	0.008
	SPF 1	-1.4083	0.343
	SPF 2	-2.7050	0.077

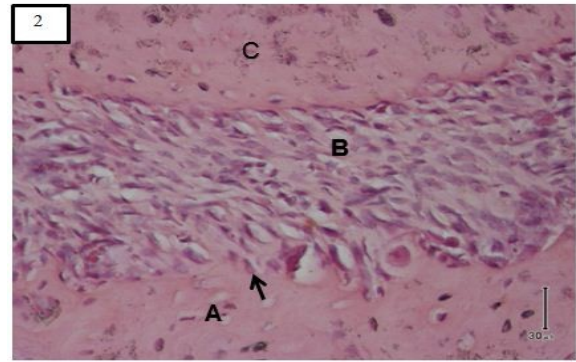
Keterangan: * menunjukkan adanya perbedaan signifikan

Secara mikroskopis perubahan jumlah osteoblas ditunjukkan pada gambar berikut.



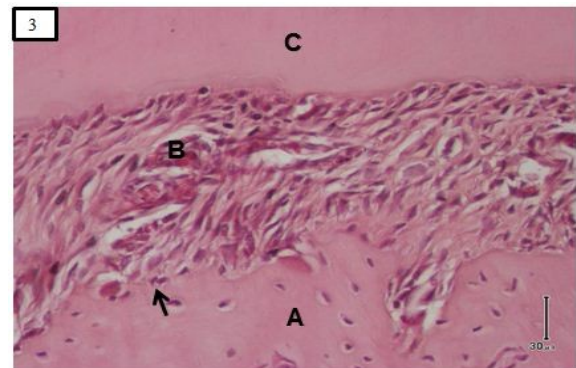
Gambar 1: Potongan melintang jaringan periodontal dengan pewarnaan HE perbesaran 400x pada kelompok hari ke 0. Anak panah menunjukkan sel osteoblas.

Keterangan: A. Sementum,
B. Ligamen Periodontal,
C. Tulang Alveolar



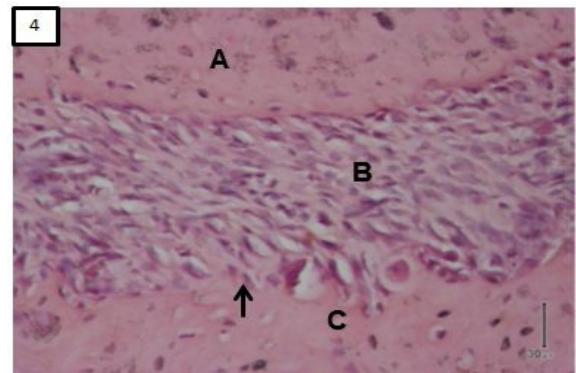
Gambar 2: Potongan melintang jaringan periodontal dengan pewarnaan HE perbesaran 400x pada kelompok hari ke 7. Anak panah menunjukkan sel osteoblas.

Keterangan: A. Sementum
B. Ligamen Periodontal
C. Tulang Alveolar



Gambar 3: Potongan melintang jaringan periodontal dengan pewarnaan HE perbesaran 400x pada kelompok hari ke 14. Anak panah menunjukkan sel osteoblas.

Keterangan: A. Sementum
B. Ligamen Periodontal
C. Tulang Alveolar



Gambar 4: Potongan melintang jaringan periodontal dengan pewarnaan HE perbesaran 400x pada kelompok hari ke 28. Anak panah menunjukkan sel osteoblas.

Keterangan: A. Sementum,
B. Ligamen Periodontal,

C. Tulang Alveolar

Pembahasan

Saat tubuh mengalami *distress*, maka di dalam otak stresor yang diterima akan diolah dan diterjemahkan ke dalam suatu proses fisiologis sebagai respon pertahanan dari host. Bagian dalam otak yang memiliki peran penting dalam merespon suatu *distress* adalah hipotalamus. Fungsinya mengatur tingkah laku emosional dan dorongan motivasional, serta berperan dalam mengatur fungsi internal tubuh seperti suhu tubuh, osmolaritas cairan dan sebagainya, yang berfungsi sebagai respon pertahanan dari *distress* yang terjadi [4].

Respon pertahanan host terhadap *distress* dipengaruhi oleh dua sistem penting, yaitu sistem neurotransmitter dan sistem hormonal. Kedua sistem ini saling terkait dalam menciptakan suatu respon terhadap terjadinya *distress* di dalam tubuh [13].

Sistem neurotransmitter adalah sistem komunikasi antar neuron dalam hipotalamus yang melibatkan mediator kimiawi yang biasa disebut neurotransmitter. Teraktivasi sistem neurotransmitter pada hipotalamus akan menyebabkan sistem hormonal teraktivasi [14].

Aktivasi sistem hormonal dimulai dari jalur HPA (*hipotalamus/pituitary/adrenal*) yang teraktivasi, yang ditandai dengan hipotalamus mensekresi *Corticotropic Releasing Hormone* (CRH) ke dalam aliran darah portal hipotalamus-hipofisis. CRH menstimuli hipofisis anterior untuk mensekresi *Adenocorticotropic Hormone* (ACTH). ACTH ini beredar di dalam darah ke seluruh tubuh, sampai pada korteks adrenal ACTH akan memicu korteks adrenal untuk mensekresi hormon glukokortikoid, salah satu jenis hormon glukokortikoid yang paling banyak disekresi saat tubuh mengalami *distress* adalah kortisol [4].

Ketika *distress* berlangsung terus menerus dalam jangka waktu lama (kronis), maka diduga produksi hormon kortisol juga akan meningkat. Peningkatan hormon kortisol ini bertujuan untuk menjaga homeostatis tubuh [2].

Peningkatan hormon kortisol ini secara tidak langsung disebabkan oleh peningkatan katekolamin. Peningkatan kadar katekolamin akan meningkatkan sekresi sitokin proinflamatori antara lain interleukin (IL)-1, (IL)-6 dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α . Sitokin ini yang akan mengaktivasi HPA axis, sehingga meningkatkan sekresi kortisol [15]-[16].

Osteoblas adalah sel yang memiliki peranan penting terhadap pembentukan tulang hingga proses remodeling tulang. Proses remodeling tulang merupakan suatu proses yang sangat penting untuk menjaga homeostatis tulang [17].

Kelompok perlakuan hari ke 0 (SPF 0), diduga tikus tidak mengalami *distress*, maka jumlah osteoblas yang diperoleh pada kelompok ini dianggap jumlah osteoblas normal tanpa adanya apoptosis. Pada perlakuan minggu ke 0 ini, hormon kortisol diduga berada pada kadar normal, sehingga tidak akan berpengaruh patologis terhadap sel-sel osteoblas yang dapat menyebabkan apoptosis osteoblas.

Kelompok perlakuan 7 hari (SPF 1) diketahui jumlah osteoblas menurun dibandingkan dengan jumlah osteoblas pada kelompok perlakuan hari ke 0 (SPF 0). Terjadinya penurunan jumlah osteoblas pada kelompok SPF 1 diduga karena adanya peningkatan sekresi kortisol yang dapat menyebabkan apoptosis pada osteoblas.

Paparan hormon kortisol yang berlebihan akan menyebabkan aktivasi prekursor apoptosis pada osteoblas. Kortisol akan berikatan dengan reseptornya yaitu Glukokortikoid Reseptor (GR) di dalam sitoplasma sel osteoblas. Ikatan antara kortisol dengan GR tersebut selanjutnya akan mengaktivasi *Glycogen Synthase Kinase 3 β* (GSK3 β). GSK3 β merupakan enzim kinase yang memiliki peran penting dalam proses apoptosis pada berbagai macam jenis sel [6].

GSK3 β terdistribusi di dalam sitosol, mitokondria dan inti sel, dimana aktivasi dari enzim ini akan mengaktivasi *Caspase 3* yang merupakan prekursor apoptosis suatu sel. Akibat terjadinya apoptosis akan menyebabkan pengurangan jumlah osteoblas [6].

Kelompok perlakuan 14 hari (SPF 2), terjadi peningkatan jumlah osteoblas dibandingkan dengan kelompok SPF 1. Hal ini terjadi karena kadar kortisol mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan SPF 1. Penurunan kadar kortisol ini diduga karena terjadinya suatu umpan balik negatif dari kortisol itu sendiri untuk menstabilkan konsentrasi kortisol dalam plasma.

Peningkatan kadar kortisol akibat *distress* kronis yang terjadi, akan menyebabkan efek inhibitorik pada hipotalamus dan hipofisis anterior, sehingga sekresi kadar kortisol menurun. Penurunan kadar kortisol ini diduga menyebabkan proses apoptosis pada osteoblas tidak berlanjut [18].

Sel akan menyeimbangkan kondisi agar apoptosis tidak berlanjut yaitu dengan cara penurunan kadar kortisol akan direspon oleh sel osteoblas dengan mengaktivasi suatu enzim yang disebut *p38-Mitogen-Activated proteinkinase* p38-(MAPK). p38-MAPK teraktivasi sebagai suatu *cellular respon* terhadap suatu *distress*. *p38-Mitogen-Activated proteinkinase* p38-(MAPK) merupakan enzim-enzim kompleks yang dapat menghubungkan epitop membran sel, atau bagian-bagian yang mampu memicu respon seluler untuk pengaturan pada intraseluler. p38-MAPK berperan untuk mengontrol ketahanan dan adaptasi sel sebagai respon dari *distress* kronis yang terjadi [6].

Kelompok perlakuan 28 hari (SPF 4) terjadi penurunan jumlah osteoblas yang signifikan dibandingkan dengan kelompok perlakuan hari ke 0 (SPF 0). Hal ini terjadi karena peningkatan sekresi kortisol pada kelompok SPF 4 ini mencapai kadar yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya.

Peningkatan kadar kortisol ini karena stresor yang diterima berlangsung terus menerus, sehingga menyebabkan efek inhibitorik kortisol pada hipotalamus dan hipofisis menurun. Sama seperti pada kelompok perlakuan SPF 1, kadar kortisol yang sangat tinggi akan menyebabkan peningkatan apoptosis osteoblas sehingga terjadi pengurangan jumlah osteoblas yang signifikan [18].

Berdasarkan penjelasan di atas, diketahui bahwa dalam kondisi tubuh tidak mampu beradaptasi dengan stresor yang mengenai, maka stresor yang diterima akan menyebabkan suatu kondisi yang mengarah pada keadaan patologis. Hal tersebut diduga menyebabkan apoptosis pada osteoblas akibat produksi hormon kortisol secara berlebihan sebagai akibat respon tubuh terhadap *distress* kronis yang terjadi. Sebaliknya, ketika tubuh mampu beradaptasi terhadap stresor yang mengenai, maka proses fisiologis tubuh dalam menanggapi stresor akan berjalan normal dan tidak akan menimbulkan suatu kondisi patologis.

Simpulan dan Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, disimpulkan bahwa perbedaan lama waktu *distress* kronis terbukti mempengaruhi penurunan jumlah osteoblas pada tulang

alveolar tikus *Sprague dawley*. Jumlah osteoblas yang paling tinggi terjadi pada hari ke 0, sedangkan jumlah osteoblas yang paling rendah terjadi pada hari ke 28.

Saran yang diberikan penulis adalah perlu diadakan penelitian selanjutnya untuk mengetahui kadar kortisol pada keadaan normal, *distress* kronis maupun *distress* akut, serta perlu ditambahkan kelompok kontrol untuk masing-masing kelompok perlakuan, yakni kontrol hari ke 0, 7, 14 dan 28 agar dapat dibandingkan dengan sampel yang diberi stresor renjatan listrik selama 0, 7, 14, 28 hari. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan daerah perhitungan yang lebih relevan, melibatkan seluruh permukaan akar mesial dan distal agar diperoleh hasil lebih akurat

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan terimakasih kepada drg. Zahreni Hamzah, M.S selaku dosen penyelenggara proyek penelitian ini.

Daftar Pustaka

- [1] Suhartono, E. Stress Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus. *Majalah Kedokteran Indonesia*. [Internet] 2005 Februari. 5(2):86-91.
- [2] Selye, H. History and Present Status of The Stress Concept. Dalam *Books of Stress Theoretical and clinical aspect*. Editor: Gold Belger, L and Boznitz, S. 1982.
- [3] Charles, F. *Schwartz's Principles of Surgery*. 8th Edition. USA:Mc Graw-Hill's Companies. 2003.
- [4] Guyton, Arthur C and Jhon, E. Hall. *Buku Ajar Fisiologi kedokteran*. Edisi 11. Alih bahasa oleh LMA. Ken Ariata Tengadi. Jakarta: EGC; 2007.
- [5] Putra, S, T. *Psikoneuroimunologi Kedokteran*. Edisi 2. Surabaya: Pusat Penerbitan dan Pencetakan Unair (AUP); 2011.
- [6] Yun, S. I., Yoon, H. Y., Jeong, S. Y., Chung, S. *Glucocorticoid Induce Apoptosis os Osteoblast Cell trough the Activation of Glycogen Synthase Kinase 3β*. *J Bone Miner Metab*. 2009 Oct; 27: 140-148.

- [7] Asnar, E.T.P. Peran Perubahan Limfosit Penghasil Sitokin dan Peptida Motilitas Usus Terhadap Modulasi Respon Imun Mukosal Tikus yang Stres Akibat Stresor Renjatan Listrik Suatu Pendekatan Psikoneurologi. Disertasi Program Doktor, Program Pasca Sarjana. Surabaya: Universitas Airlangga; 2011.
- [8] Notoatmodjo, S. Metodologi Penelitian Kesehatan. Jakarta: Rineka Cipta; 2010.
- [9] Lv, Xin., Li, Qiang., Wu, Shun., Sun, Jing., hang, Min., Chen, Yong-Jin., Psychological Stress Alters the Intrastructure and Increase IL- IL-1 β and TNF- α in Mandibular Condylar artilage. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 2012: Vol. 45: 68-967.
- [10] Sudiana. I. K. *Technik Praktis Untuk Sel Jaringan*. Bali: CV. Dharma Shandi; 1993.
- [11] Kiernan, J.A. *Histological and Histochemical Methods Theory and Practice. Department of Anatomy*. Canada: Pergamon Press; 1981.
- [12] Corwin, E. J. *Buku Saku Patofisiologi* Jakarta: EGC; 2009.
- [13] Triwahyudi, Zecky, E., Purwoko, Y. Artikel Medika Muda. Semarang: Universitas Diponegoro.2010.
- [14] deGroot J. Neuroanatomi Korelatif Edisi ke-21. Jakarta: Penerbit buku Kedokteran EGC : 151-60. 1995.
- [15] Nasution, IK. Stres Pada Remaja. Medan: Publikasi Program Studi Psikologi Universitas Sumatera Utara. 2007.
- [16] Zhou, D., Alexander WK, Michael RS, Melissa D, Bruce SR. Exposure to Physical and Psychological Stressors Elevates Plasma Interleukin 6: Relationship to The Activation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *J Endocrinology*. 1993; 133 (6): 2523-2530.
- [17] Neve, A., Corrado, A., and Cantatore, F.P., Osteoblast Physiology ini Normal and Pathological Conditions. *Cell tissue Res*. 2010. 41:1086-91.
- [18] Sherwood, L. Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2000.