

Pengaruh Lama Pemberian Distres Kronis terhadap Aktivitas Sel Osteoklas pada Tulang Alveolar Tikus *Sprague-Dawley* (The Effect of Chronic Distress Duration to Osteoclast Cells Activity in Alveolar Bone of *Sprague-Dawley* Rats)

Maria Devitha¹, Didin Erma Indahyani², Happy Harmono³
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail korespondensi: didinermae@yahoo.com

Abstract

Excessive and prolonged distress (chronic) can cause damage to periodontal tissues, specifically alveolar bone resorption. Alveolar bone resorption is caused by osteoclast cells activity. The purpose of the research is to determine effect of chronic distress duration to osteoclast cells activity in alveolar bone of male Sprague-Dawley rats attain the age of 3-4 months. 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. Osteoclasts activity were observed histologically with 400x magnification using osteoclast Bone Interface (OBI) Index by dividing the length of howship's lacunae with osteoclasts. Result showed significant difference at 0.00 ($p < 0.05$) between the variable. Activity of osteoclasts in alveolar bone of Sprague-Dawley rats which were exposed to the stressor is increased when compared to the group that were not exposed to electrical shock stressor, but at day 14 decreased when compared to the other treatment groups.

Keyword : chronic distress, osteoclast activity, alveolar bone

Abstrak

Distres yang berlebihan dan berlangsung lama (kronis) dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan periodontal, yakni resorpsi pada tulang alveolar. Resorpsi pada tulang alveolar disebabkan adanya peningkatan aktivitas sel osteoklas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama pemberian distres kronis terhadap aktivitas sel osteoklas pada tulang alveolar tikus *Sprague-Dawley* jantan berusia 3-4 bulan. Tikus diberi stresor renjatan listrik (*Electrical Foot Shock*) yang menyebabkan distres 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. Aktivitas osteoklas diamati secara histologis dengan perbesaran 400x menggunakan *Osteoclast Bone Interface (OBI) Index* dengan cara membagi panjang dari *howship's lacunae* dengan osteoklas yang berada di dalamnya. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan signifikan sebesar 0,00 ($p < 0,05$) antar variabel. Aktivitas osteoklas pada tulang alveolar tikus *Sprague-Dawley* yang dipapar stresor meningkat jika dibandingkan dengan kelompok yang tidak dipapar stresor renjatan listrik, namun pada hari ke 14 mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya.

Kata kunci : distres kronis, aktivitas osteoklas, tulang alveolar

Pendahuluan

Distres, atau disebut stres dalam kehidupan sehari-hari merupakan stres yang bersifat destruktif, membebani tubuh dan menyebabkan masalah fisik atau psikologis. Distres berkepanjangan akan menyebabkan tubuh mudah terkena penyakit dan gangguan psikosomatis [1]. Studi yang dilakukan di berbagai negara menunjukkan bahwa stres merupakan suatu penyakit global yang diakibatkan oleh banyak faktor, misalnya distres akibat kondisi keuangan dengan prevalensi sebesar 75%, distres akibat pekerjaan sebesar 70%, dan distres akibat hubungan yang kurang baik dengan orang sekitar mencapai prevalensi 58% yang terjadi di Amerika [2].

Menurut Kusmiati dan Desminiarti (1990), terdapat beberapa penyebab stres. Stres fisik disebabkan oleh suhu atau temperatur yang terlalu tinggi atau rendah, suara amat bising, sinar yang terlalu terang, atau tersengat arus listrik, sedangkan stres psikis disebabkan oleh rasa frustrasi, konflik, krisis dan tekanan. Selain itu, stres juga dapat disebabkan oleh bahan kimia (asam-basa kuat, obat-obatan, zat beracun, hormon, atau gas), mikrobiologi (virus, bakteri, parasit), fisiologi (gangguan sistemik), serta gangguan proses pertumbuhan dan perkembangan [3].

Salah satu stresor yang dapat menyebabkan stres fisik dan psikologis adalah stresor renjatan listrik. Stresor ini menyebabkan nyeri atau gangguan sensasi yang menyakitkan atau menekan perasaan. Stresor ini dapat berpengaruh terhadap kesehatan melalui perubahan respon imun yaitu axis hipotalamus-pituitari-adrenal yang menyebabkan peningkatan kadar kortisol dan penurunan jumlah sel imunokompeten dan sitokin dalam darah [4].

Stres yang terlampau besar dan berlangsung lama dapat menyebabkan perubahan patologis pada tubuh [5], termasuk jaringan periodontal. Beberapa studi menunjukkan bahwa stres merupakan salah satu faktor pemicu timbulnya penyakit periodontal seperti resorpsi tulang yang menyebabkan kegoyangan atau kehilangan gigi [6,7].

Saat stres, terjadi peningkatan katekolamin yang akan memicu sekresi sitokin proinflamatori, seperti interleukin (IL)-1, interleukin (IL)-6, dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α . Sitokin akan

menyebabkan aktivasi dari *Hypotalamus-Pituitary-Adrenal* (HPA) Axis. Teraktivasinya HPA Axis ini menyebabkan peningkatan sekresi *Corticotrophin Releasing Factor* (CRF). CRF akan merangsang pituitari anterior untuk mensekresi *Adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) yang dibawa melalui aliran darah ke korteks adrenal, yang menyebabkan lepasnya sekelompok hormon, termasuk kortikosteron yang dapat masuk ke dalam sel karena sifatnya yang lipofilik. Hormon ini akan memberikan umpan balik negatif; jika kortikosteron meningkat maka pembentukan sitokin akan diturunkan, sehingga tubuh terhindar dari kerusakan. Pada stres kronis, paparan hormon-hormon ini berlangsung terus menerus dalam konsentrasi tinggi. Hal ini direspon oleh sel progenitor osteoklas dengan cara menurunkan ekspresi dari reseptor glukokortikoid, sehingga terjadi penurunan aksi antiinflamasi [8]. Penurunan aksi antiinflamasi oleh kortisol ini menyebabkan kadar sitokin semakin tinggi sehingga terjadi kerusakan jaringan periodontal [7].

Peningkatan sitokin juga akan memicu perubahan pre osteoklas menjadi osteoklas dan menyebabkan terjadinya resorpsi tulang [9]. Sitokin akan memicu *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL) berikatan dengan *Receptor Activator of NF- κ B* (RANK) pada permukaan osteoklas untuk mengubah pre osteoklas menjadi osteoklas [10]. Sitokin juga menyebabkan penurunan ekspresi osteoprotegerin (OPG) yang merupakan penghambat osteoklastogenesis, sehingga memudahkan RANKL berikatan dengan RANK. Akibatnya, aktivitas osteoklas akan meningkat dan menyebabkan resorpsi tulang [11].

Berdasarkan uraian tersebut, maka perlu diketahui tentang aktivitas sel osteoklas pada tulang alveolar tikus *Sprague-Dawley* yang mengalami distres kronis dibandingkan dengan tikus *Sprague-Dawley* yang tidak dipapar stresor.

Metode Penelitian

Jenis penelitian adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada bulan November 2013-Maret 2014.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang pemeliharaan, timbangan untuk menimbang tikus, *Electrical Foot Shock*, *blade scalpel*, gunting bedah, *stopwatch* merk Digital 725, masker, *handscoon*, *cassete* penyimpanan jaringan, mikrotom, slide preparat, kuas, mikroskop, *cutter*, pinset, tabung untuk inhalasi, dan *shaker*, *shaker*, *hotplate*, *waterbath*, kulkas penyimpanan bahan serta aplikasi *Microsoft Office PowerPoint 2007*.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Sprague-Dawley* jantan berusia 3-4 bulan, makanan dan minuman tikus yang beredar di pasaran yaitu pakan tipe BR2 dan PP3 yang dicampur dengan perbandingan 3:1, eter, alkohol 100%, 95%, 90% dan 70%, buffer formalin 10%, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (EDTA) 15%, *Poly-L-Lysin*, parafin, aquades, larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4, *xylol*, larutan Hematoxilin Eosin (HE), dan *Canada Balsem*.

Berdasarkan rumus Federer, jumlah subjek penelitian yang digunakan adalah sebanyak 6 subjek untuk tiap kelompok perlakuan, sehingga total subjek penelitian adalah 24 ekor.

Hewan coba dan prosedur penelitian dilakukan pengurusan *ethical clearance* di Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Kemudian dilakukan tahap persiapan hewan coba, yakni hewan coba diadaptasikan dan diberi makan dalam lingkungan kandang yaitu bak plastik ukuran 35 x 40 x 60 cm selama minimal 1 minggu kemudian ditimbang dan dikelompokkan secara acak. Tikus yang berat badannya mencapai minimal 200 gram dapat diberikan perlakuan.

Tikus dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu kelompok hari ke 0 (6 tikus tidak dipapar stresor renjatan listrik), kelompok perlakuan yakni 6 tikus dipapar stresor renjatan listrik selama 7 hari, 6 tikus dipapar stresor renjatan listrik selama 14 hari, dan 6 tikus dipapar stresor renjatan listrik selama 28 hari.

Paparan stresor renjatan listrik diberikan selama 30 menit [12] selama 7, 14, dan 28 hari sesuai dengan kelompok perlakuan, dan dilakukan pukul 09.00 karena sekresi kortisol manusia di dalam plasma mencapai kadar tertinggi pada jam 8-10 pagi (50-230 ng/ml) [14]. Pengamatan dilakukan pada hari ke 0, 7, 14, dan 28.

Tikus dianestesi dengan inhalasi eter untuk dikurbankan dan diambil rahang bawah kanannya. Jaringan difiksasi dalam larutan

buffer formalin selama 24 jam, kemudian dicuci dengan larutan PBS pH 7,4. Jaringan didekalsifikasi dengan menggunakan EDTA 15% sampai lunak kemudian dipotong hingga tersisa molar 1 hingga molar 3.

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

Jaringan dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 μ m 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 HE.

Setelah diwarnai jaringan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x pada 5 lapang pandang (2 lapang pandang di 1/3 servikal, 2 lapang pandang di 1/3 tengah, dan 1 lapang pandang di 1/3 apikal) kemudian difoto. Pengukuran aktivitas sel osteoklas menggunakan *Osteoclast-Bone Interface* (OBI) *index*, yaitu dengan membagi panjang *howship's lacunae* tulang alveolar (mm) dengan jumlah sel osteoklas yang ada di dalamnya. Pengamatan dan pengukuran dilakukan oleh 3 pengamat secara manual menggunakan *Microsoft Office PowerPoint 2007*. Data pengukuran dari ketiga pengamat tersebut kemudian dikumpulkan dan dirata-rata.

Data hasil penelitian dilakukan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui normalitasnya, dan uji *Levene Test* untuk menguji homogenitasnya. Data yang terdistribusi normal dan homogen ($p>0,05$), dilakukan uji parametrik yaitu *One Way Anova*, dan dilanjutkan dengan *Least Significance Different (LSD) Test*.

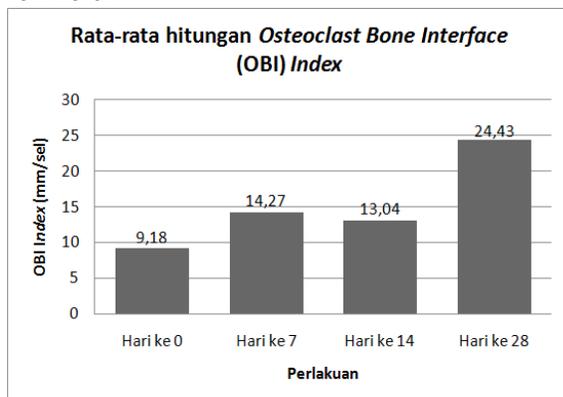
Hasil Penelitian

Hasil hitungan *Osteoclast Bone Interface* (OBI) *Index* (mm/sel) pada kelompok hari ke 0, 7, 14, dan 28 terdapat pada Tabel 1

Tabel 1. Rata-rata hitungan *Osteoclast Bone Interface (OBI) Index* pada tulang alveolar tikus *Sprague-Dawley* kelompok hari ke 0, 7, 14, dan 28 (mm/sel)

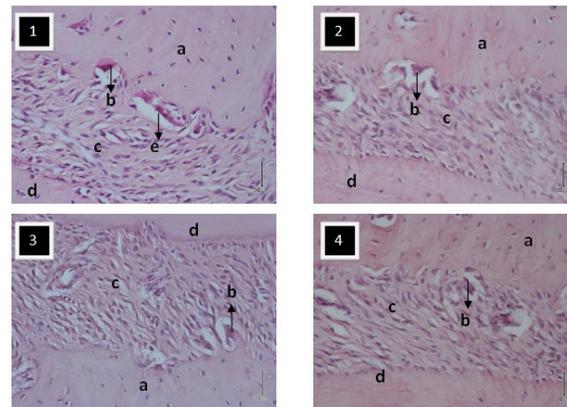
| No | hari ke-0 | hari ke-7 | hari ke-14 | hari ke-28 |
|------------------------|-----------|-----------|------------|------------|
| 1 | 9.85 | 13.48 | 12.99 | 24.64 |
| 2 | 9.89 | 13.87 | 12.81 | 23.37 |
| 3 | 8.46 | 15.38 | 13.68 | 23.91 |
| 4 | 8.77 | 13.54 | 12.57 | 24.76 |
| 5 | 10.01 | 14.25 | 13.2 | 23.78 |
| 6 | 8.13 | 15.08 | 12.99 | 26.13 |
| Mean | 9.18 | 14.27 | 13.04 | 24.43 |
| Standar Deviasi | 0.76 | 0.73 | 0.35 | 0.9 |

Rata-rata hitungan *Osteoclast Bone Interface (OBI) Index* pada tulang alveolar tikus *Sprague-Dawley* mengalami peningkatan baik pada hari ke 7, 14, dan 28 dibandingkan dengan kelompok hari ke 0.



Gambar 1. Diagram batang rata-rata hitungan *Osteoclast Bone Interface (OBI) Index* kelompok 0 hari, 7 hari, 14 hari, dan 28 hari.

Aktivitas sel osteoklas ditunjukkan dengan adanya daerah resorpsi (*howship's lacunae*) yang secara mikroskopis ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Gambaran histologis osteoklas dan *howship's lacunae* dengan pewarnaan HE dan perbesaran 400x pada kelompok hari ke 0 (1), kelompok perlakuan 7 hari (2), 14 hari (3), dan 28 hari (4).

Keterangan: a. Tulang alveolar
b. Osteoklas
c. Ligamen periodontal
d. Sementum
e. Preosteoklas

Hasil data yang diperoleh dilakukan uji normalitas data dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan menunjukkan bahwa $p > 0,05$ yang berarti distribusi data normal. Tahap selanjutnya adalah uji homogenitas dengan menggunakan *Levene Test* dan menunjukkan $p = 0,121$ ($p > 0,05$) yang berarti data homogen. Uji statistik yang digunakan adalah uji parametrik, yaitu *One Way Anova*, dan diperoleh nilai $\alpha = 0,000$ ($\alpha \leq 0,05$). Hasil uji *One Way Anova* dilanjutkan dengan *LSD Test*, dan terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan hari ke 0, 7, 14, dan 28. Nilai *Osteoclast Bone Interface (OBI) Index* meningkat baik pada hari ke 7, 14, dan 28 jika dibandingkan dengan kelompok hari ke 0, namun pada hari ke 14 mengalami penurunan jika dibandingkan dengan sesama kelompok perlakuan, dan nilai *Osteoclast Bone Interface (OBI) Index* mencapai yang paling tinggi pada hari ke 28.

Pembahasan

Aktivitas osteoklas ditandai dengan adanya daerah resorpsi. Daerah ini dikenal dengan nama *howship's lacunae*, yang berbatasan dengan tepi tajam tulang normal. Luas dari *howship's lacunae* ini kira-kira sesuai dengan ukuran osteoklas dan nampak sebagai zona yang jelas. Osteoklas yang aktif akan memulai aktivitasnya dalam meresorpsi tulang setelah

berinteraksi dengan protein pada matrik tulang, yang disebut integrin. Setelah berikatan dengan permukaan tulang, osteoklas akan mensekresi enzim kolagenase dan proteinase lainnya, asam laktat, serta asam sitrat yang dapat melarutkan matriks tulang, sehingga nantinya akan terbentuk daerah resorpsi (*howship's lacunae*). Hal ini dapat terjadi secara fisiologis seperti yang terjadi pada kelompok tanpa paparan stresor (hari ke 0) yakni kelompok yang tidak dipapar stresor renjatan listrik.

Peningkatan aktivitas osteoklas terjadi pada hari ke 7, 14, dan 28 jika dibandingkan dengan kelompok tanpa paparan stresor (hari ke 0). Peningkatan aktivitas osteoklas pada hari ke 7 diduga karena adanya peningkatan sekresi kortisol. Kortisol merupakan hormon yang dihasilkan oleh tubuh dalam kondisi stres. Pemberian stres terbukti memberikan pengaruh pada peningkatan sekresi kortisol [15]. Berdasarkan penelitian yang sama yang telah dilakukan oleh Zahreni (belum dipublikasikan), pada hari ke 7, 14, dan 28 pemaparan stresor, konsentrasi kortikosteron dalam darah lebih tinggi dibandingkan kelompok tanpa paparan stresor (hari ke 0). Hal ini terutama terjadi pada hari ke 28, dimana sekresi kortikosteron mencapai tertinggi jika dibandingkan dengan kelompok tanpa paparan stresor (hari ke 0) dan kelompok perlakuan lainnya.

Peningkatan kadar kortisol ini secara tidak langsung disebabkan oleh peningkatan katekolamin. Saat dipapar stresor renjatan listrik, sistem saraf simpatis memberi sinyal ke medula adrenal untuk melepaskan katekolamin, yaitu epinefrin dan norepinefrin, ke aliran darah [16]. Peningkatan kadar katekolamin akan meningkatkan sekresi sitokin proinflamatori. Studi telah menunjukkan bahwa tikus yang dipapar stresor mempunyai level IL-6 dalam plasma yang tinggi, bahkan pada tikus yang dipapar stresor renjatan listrik memiliki kadar IL-6 yang paling tinggi dibandingkan dengan tikus yang dipapar stresor lainnya [17]. Sitokin-sitokin inilah yang akan mengaktivasi HPA axis, sehingga meningkatkan sekresi kortisol [18].

Sebenarnya kortisol berperan dalam kontrol negatif produksi sitokin. Apabila sitokin meningkat sehingga kortisol ikut meningkat maka akan terjadi proses *feedback* atau umpan balik negatif dimana sekresi sitokin akan diturunkan. Namun stresor yang diberikan selama 7 hingga 28 hari ini sudah bersifat destruktif dan berkepanjangan (kronis) sehingga menyebabkan hormon kortisol berada dalam konsentrasi tinggi di dalam darah. Hal ini

direspons oleh progenitor osteoklas dengan cara menurunkan ekspresi dari reseptor glukokortikoid, sehingga terjadi penurunan aksi antiinflamasi [8].

Sekresi kortisol, secara tidak langsung; serta sekresi sitokin yang tinggi ini akan memicu *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL) berikatan dengan RANK pada permukaan osteoklas. RANKL merupakan protein yang terikat pada membran TNF ligand yang diekspresikan oleh osteoblas. Ikatan antara RANKL dan RANK menyebabkan diferensiasi preosteoklas menjadi osteoklas. Peningkatan sitokin juga mengakibatkan penurunan ekspresi dari OPG. OPG memiliki fungsi untuk menghambat diferensiasi osteoklas dari sel prekursor, juga sebagai reseptor dari RANKL; jika OPG bertemu dengan RANKL maka pembentukan osteoklas tidak akan terjadi. Dengan menurunnya ekspresi OPG maka memudahkan RANKL berikatan dengan RANK sehingga terjadi diferensiasi preosteoklas menjadi osteoklas.

Pada hari ke 14, aktivitas osteoklas mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan hari ke 7 dan 28. Hal ini terjadi karena pada hari ke 14 kadar kortisol mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya [15]. Penurunan sekresi kortisol ini diduga karena ada mekanisme umpan balik negatif dari kortisol itu sendiri untuk menstabilkan konsentrasi plasmanya. Jika kadar kortisol plasma mulai meningkat melebihi suatu kadar yang telah ditentukan seperti pada hari ke 7, maka kortisol menekan sendiri sekresinya lebih lanjut melalui efek inhibitorik pada hipotalamus dan hipofisis anterior [19]. Penurunan sekresi kortisol ini mempengaruhi aktivitas osteoklas melalui sitokin. Diduga dengan penurunan sekresi kortisol ini, sekresi sitokin ikut menurun sehingga RANKL sulit untuk berinteraksi dengan RANK. Selain itu, penurunan sitokin juga akan meningkatkan ekspresi dari OPG yang menyebabkan terhambatnya diferensiasi preosteoklas menjadi osteoklas.

Pada hari ke 28, aktivitas osteoklas meningkat lagi dan merupakan aktivitas osteoklas yang paling tinggi jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lainnya. Hal ini diduga karena peningkatan sekresi kortisol. Pada hari ke 28 kortisol mencapai kadar yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan hari 7 dan 14 [15]. Hal ini juga didukung oleh penelitian yang sama yang dilakukan oleh Zahreni (belum dipublikasikan)

bahwa kadar kortisol yang dihasilkan karena adanya stresor renjatan listrik pada tikus *Sprague-Dawley* mencapai kadar tertinggi pada hari ke 28. Diduga peningkatan sekresi kortisol ini karena stresor yang berlangsung terus menerus, sehingga efek inhibitorik kortisol pada hipotalamus dan hipofisis anterior menurun [19]. Sama seperti pada hari ke 7, kortisol yang sangat tinggi ini berpengaruh terhadap peningkatan aktivitas sel osteoklas melalui peningkatan sitokin proinflamatori yakni IL-1, IL-6, dan TNF- α .

Simpulan dan Saran

Kesimpulan dari penelitian ini adalah distres kronis dapat meningkatkan aktivitas sel osteoklas pada tulang alveolar tikus *Sprague-Dawley*. Namun, aktivitas osteoklas pada hari ke 14 menurun dibandingkan dengan kelompok perlakuan hari ke 7 dan 28, sedangkan pada hari ke 28 aktivitas osteoklas mencapai nilai yang paling tinggi.

Saran yang diberikan penulis adalah perlu diadakan penelitian lebih lanjut dengan menambahkan kontrol hari ke 7, 14, dan 28, serta penelitian lebih lanjut tentang efek distres kronis maupun akut pada tulang alveolar tikus *Sprague-Dawley* yang dipapar oleh bakteri penyebab penyakit periodontal. Selain itu perlu diadakan penelitian lebih lanjut tentang perlakuan yang dapat diberikan untuk mengatasi peningkatan sel osteoklas tulang alveolar pada kondisi distres kronis maupun akut.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada drg. Zahreni Hamzah, M.S yang telah memberikan kesempatan untuk bergabung dalam penelitian, serta banyak memberikan nasehat dan masukan.

Daftar Pustaka

- [1] Ide, P. *Yoga untuk Stres, 50 Gerakan Yoga Stres untuk Relaksasi Sepanjang Hari*. Jakarta: Elex Media Komputindo. 2008.
- [2] American Psychological Association. *Stress in America: Our Health at Risk*. 2012. [diakses tanggal 15 Desember 2014]. Available from: <https://www.apa.org/news/press/releases/stress/2011/final-2011.pdf>
- [3] Sunaryo. *Psikologi untuk Keperawatan*. Jakarta: EGC. 2004.
- [4] Asnar, ETP. Peran Perubahan Limfosit

- Penghasil Sitokin dan Peptida Motilitas Usus Terhadap Modulasi Respons Imun Mukosal Tikus yang Stres Akibat Stresor Renjatan Listrik Suatu Pendekatan Psiconeuroimunologi. Disertasi. Surabaya: Program Doktor, Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. 2001.
- [5] Corwin, E.J. *Buku Saku Patofisiologi*. Ed. Ke-3. Terjemahan oleh Nike Budhi Subekti. Jakarta: EGC. 2009.
 - [6] Peruzzo DC, Benatti BB, Ambrosano GM, Nogueira Filho GR, Sallum EA, Casati MZ, et al. *A Systematic Review of Stress and Psychological Factors as Possible Risk Factors for Periodontal Disease*. J Periodontol. 2007; 78: 1491-1504.
 - [7] Lacopino, AM. Relationship Between Stress, Depression and Periodontal Disease. J Can Dent Assoc. 2009; 75 (5): 329-330.
 - [8] Miller, GE., Sheldon C, A. Kim R. Chronic Psychological Stress and the Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines: A Glucocorticoid-Resistance Model. J Am Psy Assoc. 2002; 21 (6): 531-541
 - [9] Neve, A., Addolorata C dan Francesco PC. *Osteoblast Physiology in Normal and Pathological Conditions*. 2010. [diakses tanggal 15 Desember 2014]. Available from: http://www.ammom.com.mx/AMMOM/Osteoblast_physiology_in_normal_and_pathological_conditions-1.pdf
 - [10] Weitzmann, MN. The Role of Inflammatory Cytokines, The RANKL/OPG Axis, and The Immunoskeletal Interface in Physiological Bone Turnover and Osteoporosis. The Scientific World Journal. 2013; 2014: 1-29.
 - [11] Arai, F., T. Miyamoto, O. Ohneda et al., Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor κ (RANK) receptors. J Exp Med. 1999; 190 (12): 1741-1754.
 - [12] Lv, Li, Wu, Sun, Zhang, dan Chen. Psychological Stress Alters The Ultrastructure and Increases IL-1 β and TNF- α in Mandibular Condylar Cartilage. Braz J Med Bio Res. 2012; 45 (10): 968-976.
 - [13] Clarke MR, Harrison RM, Didier ES. Behavioral, Immunological and Hormonal Responses Associated with Social Change in Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). Am J Primatol. 1996; 39:223-233.
 - [14] Sudiana, IK. *Teknik Praktis untuk Jaringan*

- Sel. Bali: CV Dharma Sandi. 1993.
- [15] Mustofa, E. Efek Stres Fisik dan Psikologis pada Kortisol, PGE, BAFF, IL-21, sIgA, dan Candidiasis 2 Vulvovaginal. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 2012; 27 (1): 21-27.
- [16] Nasution, IK. Stres Pada Remaja. Medan: Publikasi Program Studi Psikologi Universitas Sumatera Utara. 2007.
- [17] 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.
- [18] Ebrecht, SRA., Mohamed AV, Feldman PJ, Kirschbaum C, dan Steptoe A. Cortisol Responses to Mild Psychological Stress are Inversely Associated with Proinflammatory Cytokines. *J Psy Res Soc*. 2003; 17 (5): 373-383.
- [19] Sherwood, L. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Terjemahan oleh: Brahm U Pendit. Jakarta: EGC. 2011. aggressive periodontitis: 12-months randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2008 Aug; 35(8): 696-704.