

IDENTIFIKASI DEOKSIPIRIDINOLIN PADA SALIVA WANITA USIA PERIMENOPAUSE

Nanda Afrita¹, Muhammad Nurul Amin², Agustin Wulan Suci D²

¹ Mahasiswa Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember

² Bagian Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember

ABSTRACT

Perimenopause is transition phase of normal ovulation cycle to menopause that signed decreasing estrogen hormone production. In this phase, women will be physiology and psychology alteration related fluctuation of estrogen hormone. The estrogen level alteration is one of cause reducing of bone density in perimenopause women. When estrogen level decreases, it will induce osteoclast activity and finally cause bone resorption. In bone resorption osteoclast secretes protease that can dissolve collagen which is in organic matrix and free bone mineral. Mature collagen is bound by pyridinium crosslink that it will be degraded in bone resorption process, such as deoxyypyridinoline. Deoxyypyridinoline have suggested as collagen degradation marker of bone resorption in serum and urine. This study was objective to identify deoxyypyridinoline in saliva of perimenopause women. The subjects of this study were perimenopause women who were 40-55 years old. The subjects had to fulfill informed consent and be undergone intra oral examination, including caries and periodontal index index. After that the subjects collected their whole saliva. Deoxyypyridinoline in saliva was identified by Liquid chromatography Mass Spectroscopy. The result showed that deoxyypyridinoline level of perimenopause women was about 23.802 ppm. This level was higher than productive women. The conclusion was deoxyypyridinoline level in saliva of perimenopause women.

Keywords: deoksipiridinolin, perimenopause, estrogen, kolagen, resorpsi tulang

Korespondensi (Correspondence): Bagian Biomedik, FKJ Universitas Jember. Jl. Kalimantan 37 Jember. Email: agustinwulan.fka@unej.ac.id

Perimenopause adalah masa transisi dari siklus ovulasi normal menuju menopause.¹ Menurut Sperof dkk, perimenopause merupakan suatu keadaan fisiologis wanita yang telah memasuki proses penuaan, yang ditandai dengan menurunnya produksi hormon estrogen ovarium.² Selama perimenopause, seorang wanita akan mengalami perubahan yang berhubungan dengan menopause yang akan datang. Setiap wanita akan mengalami masa perimenopause dengan waktu yang berbeda.¹ Liauw dkk menyatakan bahwa fase perimenopause terjadi pada wanita usia 40-55 tahun.³

Prior menyatakan bahwa 20% wanita usia perimenopause mengalami gejala perimenopause dan membutuhkan pertolongan medis.⁴ Gejala-gejala yang timbul pada masa perimenopause dapat diakibatkan karena terjadinya fluktuasi kadar hormon estrogen. Fluktuasi dari hormon estrogen ini akan mengakibatkan densitas tulang pada wanita perimenopause akan berkurang sekitar 5-15%.⁵

Hormon estrogen merupakan hormon yang sangat berpengaruh pada proses remodeling tulang. Hormon estrogen mempunyai kemampuan menghambat aktivitas osteoklas dan mengaktifkan osteoblas, sehingga laju pergantian tulang menjadi seimbang (Wardani, 2011). Ketika terjadi penurunan estrogen, maka akan terjadi osteoklastogenesis dan berlanjut dengan kehilangan tulang. Hal ini disebabkan berkurangnya estrogen sehingga merangsang aktivitas sitokin yaitu terjadinya peningkatan Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) dan Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α). Osteoklas yang berperan pada resorpsi

tulang juga akan mensekresi protease yang dapat melarutkan kolagen diantara matriks organik dan mineral tulang yang bebas.^{6,7}

Kolagen merupakan protein ekstraseluler yang terpenting dalam tubuh. Ada beberapa kolagen yang ditemukan dalam tubuh manusia yang selanjutnya dikelompokkan menjadi beberapa tipe. Kolagen tipe I merupakan kolagen yang terbanyak pada tulang, jumlahnya sekitar 90-95% total protein tulang. Struktur kolagen merupakan protein berbentuk triple helix yang terdiri dari rantai polipeptida. Triple helix ini akan diperkuat dengan ikatan piridinium.^{7,8}

Ikatan piridinium merupakan ikatan kolagen yang matur. Ikatan ini merupakan ikatan yang akan ikut terdegradasi ketika terjadi resorpsi tulang.⁷ Ikatan piridinium terdiri dari piridinolin, deoksipiridinolin, N-telopeptida, dan C-telopeptida. Deoksipiridinolin lebih spesifik daripada piridinolin oleh karena konsentrasi tertinggi deoksipiridinolin terletak pada tulang dan dentin untuk resorpsi tulang. Deoksipiridinolin juga digunakan sebagai penanda degradasi pada kolagen tipe I. Moreno dkk menyatakan bahwa deoksipiridinolin terdegradasi dan keluar melalui serum, saliva, dan urin.^{9,10}

Kemajuan teknologi saat ini telah melahirkan metode yang mampu mendeteksi adanya kerusakan atau kelainan dengan menggunakan cairan biologis tubuh, seperti serum, urin, gingival crevicular fluid (GCF), dan saliva. Penggunaan cairan biologis tubuh mempunyai kekurangan dan kelebihan. Sampel serum lebih sensitif, akan tetapi penggunaan sampel serum diperlukan peralatan khusus pada waktu pengumpulan dan penyimpanan karena serum mudah menggumpal. Pada penelitian Yu dkk

deoksipiridinolin urin telah digunakan sebagai pertanda biologis pada pasien pasca menopause. Sampel urin ini mudah dan tidak butuh peralatan khusus, akan tetapi waktu pengambilan urin harus pada pagi hari sebelum makan agar tidak mengganggu kandungan urin. Deoksipiridinolin pada GCF ini juga digunakan untuk mendeteksi penyakit periodontal, akan tetapi kelemahan dari cairan krevikular gingiva yaitu sulit dalam pengambilan dan jumlahnya sangat sedikit.¹¹

Sekarang sudah banyak penggunaan saliva sebagai pertanda biologis. Hal ini disebabkan saliva dapat diperoleh dengan mudah tanpa membutuhkan peratan khusus dan dapat diambil sewaktu-waktu. Selain itu, saliva lebih mudah, aman saat pengambilan sampel tanpa memerlukan keahlian khusus dan non-invasif. Komposisi saliva terdiri dari air (94,0-99,5%) bahan organik, dan bahan anorganik. Komponen organik dalam saliva yang utama adalah protein. Protein saliva ini dinilai dapat menjadi biomarker yang akan mendeteksi tiga hal, yaitu patogenesis dari suatu inflamasi, degradasi kolagen dan resorpsi tulang. Hampir setiap elemen yang dapat diukur dalam darah dapat diukur dengan saliva karena perkembangan nanoteknologi yang telah memungkinkan untuk menangani zat pada skala atom.¹² Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi adanya kadar deoksipiridinolin pada saliva wanita usia perimenopause.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian observasional analitik dengan pendekatan *case control*. Penelitian ini dilakukan di RSGM Universitas Jember dan Laboratorium Kimia Analisis Fakultas Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Penelitian ini mendapatkan persetujuan dari komisi etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada. Pada pemilihan subjek penelitian, dilakukan dengan pemberian kuesioner kepada pasien RSGM Universitas Jember wanita usia sekitar 30-55 tahun. Kuesioner berkaitan dengan pemeriksaan gejala perimenopause. Gejala yang paling diutamakan oleh peneliti adalah adanya perubahan siklus menstruasi. Selanjutnya subyek penelitian harus diberi penjelasan mengenai maksud dan tujuan penelitian yang akan dilakukan dan subjek mengisi serta menyetujui *informed consent*.

Subjek penelitian dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok wanita usia perimenopause (KP) dan kelompok wanita usia produktif sebagai kontrol (KK). Kriteria subjek KP dan KK adalah sebagai berikut.

1. Kelompok usia perimenopause: wanita usia 40-55 tahun, tidak mempunyai kebiasaan merokok dan minum alkohol, tidak menggunakan obat-obatan terapi hormon, tidak sedang hamil atau menstruasi, tidak memiliki penyakit sistemik, skor indeks periodontal 0,5-2,0,

karies, maksimal dengan skor ICDAS 2, dan mempunyai keluhan gejala perimenopause.

2. Kelompok usia produktif: wanita usia 30-35 tahun, tidak mempunyai kebiasaan merokok dan minum alkohol, tidak menggunakan obat-obatan terapi hormon, tidak sedang hamil atau menstruasi, tidak memiliki penyakit sistemik, skor indeks periodontal 0,5-2,0, memiliki karies, hanya boleh dengan karies superfisial dan karies media dan tidak ada keluhan gejala perimenopause

Subyek penelitian dipilih secara *purposive sampling*. *Purposive sampling* adalah pemilihan sampel dengan cara memilih sampel diantara populasi sesuai tujuan/masalah dalam penelitian.¹³ Pemilihan subyek penelitian dilakukan selama satu bulan. Jumlah subyek yang diambil sebanyak jumlah pasien RSGM Universitas Jember.

Subyek penelitian dilakukan pemeriksaan intra oral, yaitu dengan pemeriksaan karies dan pengukuran Periodontal Index. Pemeriksaan karies dilakukan dengan pemeriksaan visual dan skor karies dihitung menggunakan skor ICDAS (tabel 1).¹⁴ Penentuan tingkat kesehatan jaringan periodontal didasarkan pada Periodontal Indeks (PI) Modifikasi Russel.¹⁵

Tabel 1. Indeks Karies ICDAS

SKOR	KRITERIA
0	Tidak ada atau terdapat perubahan tipis pada enamel setelah dikeringkan dengan penyemprot udara (5 detik)
1	Terdapat perubahan visual pertama pada enamel (hanya terlihat setelah pengeringan dengan penyemprotan udara atau masih terdapat pada wilayah pit dan fisur)
2	Ditemukan perubahan pada enamel
3	Kerusakan enamel secara lokal dalam bentuk <i>opaque</i> atau diskolorisasi enamel (tanpa tanda visual dengan melibatkan dentin).
4	Terdapat bayangan gelap di bagian bawah dari dentin
5	Terdapat ruang sempit dengan dentin yang tampak
6	Terdapat lubang yang besar dengan dentin yang tampak (melibatkan lebih dari sebagian dari permukaan)

Pengambilan Sampel Saliva

Subyek penelitian diinstruksikan menyikat gigi, makan dan minum minimal 30 menit sebelum pengumpulan saliva. Saliva diambil sekitar pukul 08.00 sampai pukul 13.00. Subyek diinstruksikan menutup mulut untuk menunggu saliva terkumpul di rongga mulut tanpa diberi stimulus yang menyebabkan peningkatan produksi saliva. 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* dengan suhu -30°C sampai akan dilakukan pengukuran kadar deoksipiridinolin. Pengaturan suhu sebesar -30°C dilakukan agar protein dalam saliva tidak rusak sampai akan dilakukan pemeriksaan pada laboratorium.¹⁵

Pengukuran Kadar Deoksipiridinolin Menggunakan HPLC

a. Persiapan Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

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 300 μL /menit. Kolom yang digunakan jenis Hypersil Gold. Ukuran panjang kolom ini adalah 10cm. 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 kapiles sebesar 200°C

b. Persiapan Standar

Kalibrator piridinolin (mW = 429) dan deoksipiridinolin (mW = 413) dengan konsentrasi 2.88ppm untuk deoksipiridinolin. Larutan standar (A) diambil sebanyak 50 μL lalu diencerkan menjadi 1mL setara dengan 144ng/mL deoksipiridinolin. Larutan standar (B) diambil sebanyak 75 μL diencerkan menjadi 1 mL setara dengan 216 ng/mL deoksipiridinolin. Standard diinjeksikan dengan volume injeksi mulai dari 1 μL sampai dengan 12 μL .

c. Preparasi Sampel

Sampel diambil sebanyak 5 μL sampai dengan 500 μL diencerkan menjadi 1 mL. Larutan tersebut disaring dengan menggunakan filter nylon 0,2 μL . Sampel dianalisis dengan LC MS/MS dengan volume injeksi 0,1 μL sampai dengan 10 μL .

Hasil penelitian yang didapatkan akan diuji homogenitas dan normal data dengan uji *Kolmogorov Smirnov* dan *Levene Statistic Test*. Bila hasil ujinya menunjukkan data normal dan homogen maka uji statistiknya dengan menggunakan uji parametrik yaitu *independent T-test*, sedangkan jika hasilnya menunjukkan data tidak normal maka uji statistik yang digunakan adalah uji non parametrik yaitu *Mann Whitney*.

HASIL

Tabel 2 menunjukkan rata rata kadar deoksipiridinolin pada wanita usia perimenopause dan wanita usia produktif sebagai kontrol. Kadar deoksipiridinolin pada saliva wanita usia produktif menunjukkan hasil

yang lebih rendah dibandingkan dengan kadar deoksipiridinolin pada saliva wanita usia produktif. Semakin besar usia wanita maka semakin tinggi kadar deoksipiridinolin pada saliva. Uji parametrik *Independent T-test* dilakukan untuk mengetahui perbedaan kadar deoksipiridinolin antar kelompok. Hasil uji *Independent T-test* didapatkan nilai signifikansi 0.779 ($p>0,05$) sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan yang tidak signifikan pada setiap kelompok.

Tabel 2. Data rata rata hasil pengukuran kadar deoksipiridinolin pada saliva wanita usia produktif dan usia perimenopause (ppm).

	N	mean
Kontrol (Usia Produktif)	5	21.078
Usia Perimenopause	5	23,802

Keterangan:

N: Jumlah Subyek Penelitian

Mean : Rata-rata Kadar Deoksipiridinolin pada Saliva

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi adanya kadar deoksipiridinolin pada saliva wanita usia perimenopause. Subyek penelitian yang dipilih adalah wanita usia perimenopause yaitu usia 40-55 tahun dan wanita usia produktif 30-35 tahun sebagai kontrol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat kadar deoksipiridinolin pada saliva wanita usia perimenopause. Jika dibandingkan dengan usia produktif, maka terlihat adanya perbedaan kadar deoksipiridinolin. Kadar deoksipiridinolin pada saliva wanita usia perimenopause memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan kadar deoksipiridinolin pada saliva wanita usia produktif.

Perbedaan usia yang diambil merupakan faktor utama yang menyebabkan adanya perbedaan kadar deoksipiridinolin pada saliva masing-masing kelompok. Usia disini berhubungan dengan proses remodelling 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. Setelah usia tersebut akan dimulainya proses resorpsi dan aposisi yang mulanya seimbang sampai dengan proses resorpsi yang akan lebih cepat dibandingkan aposisi.¹⁷

Ketika terjadi proses remodelling tulang, maka berhubungan juga dengan hormon yang mendukung pada proses itu. Salah satu hormon yang terpenting adalah hormon estrogen. Hormon ini berpengaruh pada sel yang beraktivitas pada proses remodelling tulang, baik osteoblas maupun osteoklas. Pada usia produktif, hormon estrogen masih bekerja secara baik, sehingga aktivitas osteoblas dan osteoklas pada proses remodelling tulang akan berjalan seimbang. Ketika memasuki usia perimenopause, hormon estrogen sudah mulai mengalami

kelemahan. Ini mengakibatkan aktivitas osteoblas dan osteoklas tidak seimbang, sehingga resorpsi akan lebih banyak terjadi dibandingkan dengan aposisi.¹⁸

Pada proses remodeling tulang, sel osteoblas merupakan sel yang bertugas pada pembentukan tulang dan bertugas pada proses mineralisasi tulang. Ketika matang sel ini dapat mengekspresikan senyawa kimia yang bisa digunakan sebagai pertanda biologis seperti kolagen tipe I, alkaline fosfatase. Hormon estrogen berespons mengaktifkan faktor pertumbuhan yaitu IGF-I sehingga terjadi cross-talk antara IGF-I dan Estrogen. IGF-I berperan pada proses proliferasi dan diferensiasi osteoblas. IGF-I terdapat pada ekstrak tulang dari berbagai spesies dan diketahui sebagai salah satu mitogenik yang jumlahnya cukup banyak baik pada fetus maupun pada tulang dewasa.^{19,20}

Estrogen juga mempengaruhi proses pembongkaran tulang dengan cara menghambat pematangan osteoklas sehingga bisa menghambat resorpsi tulang. Progenitor osteoblas akan mensekresikan RANKL/ODF yang akan membentuk ikatan yang bersifat aktif dengan RANK pada sel progenitor osteoklas dan akan mengakibatkan terjadi pematangan osteoklas sehingga membentuk osteoklas yang fungsional, dan pada saat yang sama juga akan disekresikan faktor penghambat osteoklastogenesis yang dikenal sebagai osteoprotegerin (OPG). OPG kemudian akan berikatan dengan RANKL untuk menghambat osteoklastogenesis. Estrogen meningkatkan sekresi osteoprotegerin yang kemudian akan berikatan dengan RANK ligan untuk kemudian dapat menghambat resorpsi tulang.^{19,20}

Pada dasarnya, ketika osteoklas telah terbentuk, osteoklas akan melekat pada permukaan matriks tulang dan akan memulai tahap resorpsi. Sebelum migrasi ke matriks tulang, osteoklas tersebut akan melewati sederetan lining osteoblas pada permukaan tulang untuk dapat mengeluarkan enzim proteolitik. Proses resorpsi dimulai dengan osteoblas yang mensekresikan ion hidrogen yang dibentuk dari karbonik anhidrase. Ion hidrogen tersebut memasuki plasma membran untuk melarutkan matriks tulang. Selanjutnya disekresikan pula enzim lisosom terutama cathepsin K untuk mencerna matriks tulang. Disinilah kolagen dan seluruh komponen matriks tulang terdegradasi.¹⁹

Resorpsi tulang dapat diketahui melalui terdegradasinya produk kolagen tulang antara lain ikatan piridinium yaitu piridinolin dan deoksipiridinolin. Deoksipiridinolin pada dasarnya memberikan kekuatan dan kekerasan pada tulang. Pada saat terjadi resorpsi tulang, terjadi pula degradasi pada kolagen tulang yang matur dan deoksipiridinolin ikut terlepas masuk sirkulasi darah dan ginjal dan tersekreasi melalui urin dan serum. Selain melalui urin dan serum, terdapat penelitian yang menyebutkan

bahwa deoksipiridinolin dapat tersekreasi melalui saliva.¹⁰

Berdasarkan uji Independent T-test perbandingan kadar deoksipiridinolin pada saliva wanita usia perimenopause dengan wanita usia produktif menunjukkan adanya perbedaan yang tidak signifikan. Perbedaan yang tidak signifikan ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Faktor usia merupakan salah satu yang mempengaruhi hasil penelitian ini tidak signifikan. Tingginya kadar deoksipiridinolin wanita usia produktif diketahui akan terjadi pada usia 20-29 tahun. Diketahui juga bahwa tidak ditemukan perbedaan yang signifikan kadar deoksipiridinolin pada urin antara usia 30-50 tahun. Aktivitas fisik yang berbeda-beda dari setiap subyek penelitian juga mempengaruhi perbedaan kadar deoksipiridinolin. Telah dilakukan penelitian mengenai hubungan antara aktivitas fisik subyek penelitian dengan kadar deoksipiridinolin. Peningkatan kadar deoksipiridinolin pada urin terlihat pada subyek penelitian dengan kondisi istirahat total selama 4 hari.²¹

Kualitas saliva dari setiap subyek penelitian merupakan salah satu faktor yang menyebabkan perbedaan ini tidak signifikan. Beberapa pasien memiliki perbedaan viskositas saliva, sebagian sangat cair dan sebagian lagi kental. Viskositas ini mempengaruhi dari kadar deoksipiridinolin pada saliva tersebut. Faktor yang tersebut diatas adalah faktor dalam pemilihan subyek penelitian. Faktor lain yaitu faktor dalam proses penelitian seperti jumlah subyek penelitian. Dengan jumlah subyek penelitian yang terhitung sedikit, ini tidak bisa mewakili dari seluruh variabel yang terkendali. Selain dari jumlah subyek penelitiannya, ada juga faktor dari penggunaan alat yang digunakan. Alat yang digunakan disini adalah LC MS/MS. Deoksipiridinolin dinilai sangat sensitif jika menggunakan alat seperti Elisa Kit.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat kadar deoksipiridinolin pada saliva wanita usia perimenopause. Selain itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kadar deoksipiridinolin pada saliva wanita usia perimenopause menggunakan teknik lain dan mengenai pengaruh usia terhadap kadar deoksipiridinolin.

DAFTAR PUSTAKA

1. Frackiewicz, E. J & Cutler, N.R. Women's Health Care During the Perimenopause. *J. AM Pharm Assoc* 2000, 40 (6).
2. Speroff, L., Glass, R.H. Kase, N.G. *Clinical Gynecological Endocrinology and Infertility*. 6th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 1999

3. Prior, Jerylin C. Perimenopause: The Ovary's Frustrating Grand Finale. *BC Endocrine Research Foundation* 2001, 3 (3).
4. Prior, Jerylin C. Clearing Confusion About Perimenopause. *BC Medical Journal* 2005, 47 (10).
5. Zulkarnaen, Yandi. *Gejala-gejala Wanita Perimenopause*. Referat III. Palembang: Universitas Sriwijaya. 2003
6. Thanaseelan, Rathidevi. Gambaran Pengetahuan Tentang Osteoporosis pada Wanita dalam Usia Premeopause di Medan. 2010. Karya Tulis Ilmiah. Universitas Sumatera Utara.
7. Morawati, Soufni. Kadar β -Cross-Links Telo peptide pada Wanita Postmenopause dengan Osteoporosis atau Osteopoeni. Tesis. Universitas Sumatera Utara. 2009
8. Gelse, K., Poschl, E., Aigner, T. Collagen-Structure, Function, and Biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Review* 2003, 55: 1531-1546.
9. Toussirof, Richard-Blum, Dumoulin, Cedoz, Wendling. Relationship Between Urinary Pyridinium Crosslinks, Disease Activity and Disease Subsets of Ankylosing Spondylitis. *British Society for Rheumatology* 1999, 38: 21-27.
10. Moreno, Restrepo, Guzman, Arroyave. Screening for Salivary Levels of Deoxypyridinoline and Bone-specific Alkaline Phosphatase during Orthodontic Tooth Movement: a Pilot Study. *European Journal of Orthodontics* 2012, 35 (3): 361-368
11. Fine, Daniel H., Furgang, David. Salivary Bioassay for Early Detection of Bone Loss. United States Patent. 2010
12. Kathariya, R. Pradeep, A. R. Salivary Proteomic Biomarkers for Oral Diseases: A Review of Literature. *Archives of Oral Science and Research* 2010, 1(1):43-49.
13. Maryani, L., Muliani, R. *Epidemiologi Kesehatan*. Yogyakarta: Graha Ilmu. 2010
14. Braga MM, Mendes FM, Ekstrand KR. Detection Activity Assessment and Diagnosis of Dental Caries Lesions. *Dent Clin N Am*. 2010; 54: 479-493.
15. Carranza, F.A. *Clinical Periodontology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1990.
16. Chiappin, Antonelli, Gatti Palo. Saliva specimen: A New Laboratory Tool for Diagnostic and Basic Investigation. *Clinica Chimica Acta*. 2007, 383: 30-40.
17. Emerk, Kaya. Bone Markers and Osteoporosis. *Jugoslav Med Biohem*. 2004, 23 (3): 221-228.
18. Sennang, Mutmainnah, Pakasi, dan Hardjoeno. Analisis Kadar Oseokalsin Serum Osteopenia dan Osteoporosis. *Indonesian Journal of Pathology and Medical Laporatory* 2006, 12(2).
19. Vesper HW. Measurement of pyridinoline and deoxypyridinoline in metabolic bone disease. *CLI*. 2005.
20. Mahmudati N. Kajian Biologi Molekuler Peras Estrogen/ Fitoestrogen pada Metabolisme Tulang Usia Menopause. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. 2011; 2(1).
21. Vesper, Demers, Eastell, Garnero, Kleerekoper, Robins, et al. Assesment and Recommendations on Factors Contributing to Preanalytical Variability of Urinary Pyridinoline and Deoxypyridinoline. *Clinical Chemistry*. 2002; 48 (2): 220-235