

Pengaruh Lama Distres Kronis Terhadap Perubahan Jumlah Sel Osteoklas Pada Tulang Alveolar Tikus *Sprague dawley*

(The Effect of Chronic Distres Duration on Osteoclast Changes in Alveolar Bone of Sprague dawley Rats)

Cicik Khilar Rizqi¹, Happy Harmono², Raditya Nugroho³

¹²³ Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember
Jalan Kalimantan No. 37, Jember 68121
e-mail: hp_harmono@yahoo.co.id

Abstract

Chronic distress is a psycho-physiological reaction of stimuli that disrupt homeostasis which cause damage to the body, one of kind is an electrical shock stressor. The distress can increase catecholamines level in considerable amounts and allegedly it produce pro-inflammatory cytokines. Cytokine will affect the Hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis to produce cortisol and also act as negative control of cytokines. In this assumption, cytokines can increase bond of osteoclast formation key mediator which is RANKL with its receptor (RANK) to produce osteoclasts. This study was an experimental laboratories research using 8 weeks old Sprague dawley rats with body weight 200-250 gram as samples to observe increase of the number of osteoclasts in the alveolar bone. A total of 32 samples were divided into 4 groups: the rats group exposed with electrical shock stressor for 0, 7, 14, and 28 days. Then samples were processed by tissue processing until it's ready to observe using an electron microscope with 400x magnification. The results showed that there were significant differences ($p < 0.05$) between groups. It is concluded that the number of osteoclasts alveolar bone osteoclast were increased in Sprague dawley rats that experienced chronic distress.

Keywords: stress/distress, catecholamines, cytokine, cortisol, osteoclast

Abstrak

Distres kronis merupakan reaksi psiko-fisiologis tubuh terhadap rangsangan yang mengganggu homeostasis yang mengakibatkan kerusakan pada tubuh, salah satunya adalah stresor renjatan listrik. Distres tersebut diduga dapat meningkatkan kadar katekolamin yang akan memicu produksi sitokin pro-inflamatori. Sitokin akan mempengaruhi hipotalamus pituitari adrenal (HPA) axis untuk memproduksi kortisol dan hormon ini juga berperan sebagai kontrol negatif terhadap sitokin. Sitokin juga diketahui dapat meningkatkan ikatan yang terjadi pada kunci mediator pembentuk osteoklas yakni RANKL dengan reseptornya (RANK) sehingga terbentuklah sel osteoklas. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan tikus *Sprague dawley* berumur 8 minggu dengan berat 200-250 gram sebagai sampel untuk dilihat peningkatan jumlah sel osteoklas pada tulang alveolarnya. Sebanyak 32 sampel dibagi menjadi 4 kelompok yakni kelompok yang diberi paparan stresor renjatan listrik selama 0, 7, 14, dan 28 hari. Kemudian dilanjutkan dengan pemrosesan jaringan hingga diperoleh preparat yang siap diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400x. Hasilnya menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antar kelompok. Disimpulkan bahwa terjadi perubahan pada peningkatan jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar tikus *Sprague dawley* yang mengalami distres kronis.

Kata kunci: stres/distres, katekolamin, sitokin pro-inflamatori, kortisol, osteoklas

Pendahuluan

Kegoyangan gigi merupakan suatu fenomena yang dapat dijumpai pada saat stres. Stres sendiri secara garis besar terbagi menjadi dua yakni distres dan eustres, dimana distres merupakan stres yang sifatnya merusak sedangkan eustres merupakan stres yang sifatnya membangun. Terjadinya peningkatan jumlah sel osteoklas pada kondisi distres kronis diduga mempunyai pengaruh besar terhadap proses resorpsi tulang alveolar (penyangga gigi). resorpsi pada tulang alveolar inilah yang dapat mengakibatkan kegoyangan pada gigi [1].

Penyebab dari stres atau biasa disebut dengan stresor terdiri dari berbagai macam faktor, diantaranya ialah stresor fisik, stresor psikologis, dan stresor sosial budaya[2]. Selain itu juga terdapat stresor berupa infeksi, stresor kimia, dan stresor tumbuh kembang [3].

Salah satu jenis stresor fisik-biologi ialah renjatan listrik. Renjatan listrik merupakan suatu nyeri pada saraf sensoris yang diakibatkan aliran listrik yang mengalir secara tiba-tiba pada tubuh. Stresor ini dapat mempengaruhi aksis hipotalamus-pituitari-adrenal (Aksis HPA) sehingga menghasilkan peningkatan hormon kortisol. Keadaan ini dapat mengakibatkan penurunan sel-sel imunokompeten diikuti dengan peningkatan sitokin sehingga tubuh mudah terserang infeksi dan akibatnya mudah terjadi kerusakan pada tubuh[3][4][5].

Peningkatan hormon kortisol pada kondisi stres kronis akan menyebabkan terjadinya mekanisme "down regulasi" yang merupakan mekanisme penurunan ekspresi reseptor glukokortikoid agar tidak bereaksi dengan sel sasaran secara terus-menerus. Penurunan ekspresi reseptor glukokortikoid ini salah satunya terjadi pada sel darah putih. Mekanisme inilah yang merupakan mekanisme *feedback negative* sebagai akibat peningkatan kortisol. Akan tetapi pada kondisi stres yang berkelanjutan diduga mekanisme *down regulasi* mengalami kegagalan sehingga penurunan ekspresi reseptor sel darah putih juga ikut mengalami kegagalan. Kondisi ini mengakibatkan penurunan aksi anti inflamasi yang diikuti dengan peningkatan sitokin [3].

Selain itu, adanya aktivasi dari saraf simpatis yang mengakibatkan terjadinya peningkatan katekolamin yang berupa epinefrin dan norepinefrin juga mampu memicu terjadinya peningkatan kadar sitokin dalam darah. Sehingga kondisi ini dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan lebih lanjut pada tubuh [7].

Beberapa sitokin yang meningkat diantaranya ialah interleukin (IL)-1, interleukin (IL)-6, tumor nekrosis faktor (TNF)- α . Sitokin-sitokin ini mampu menstimulasi ekspresi dari RANKL (*Receptor activator of nuclear factor κ B ligand*) yang merupakan kunci utama pembentukan sel osteoklas yang diekspresikan oleh sel osteoblas [8]. RANKL ini nantinya akan berikatan dengan reseptornya RANK (untuk aktivator *Nuclear κ B*) yang terdapat pada makrofag. Pengikatan ini memicu makrofag untuk berdiferensiasi menjadi osteoklas [3]. Namun pada TNF- α , selain mampu menstimulasi ekspresi dari RANKL juga mampu menghasilkan M-CSF (*Machrophage Colony Stimulating Factor*) yang akan berikatan langsung dengan reseptornya c-Fms (*Machrophage Colony Stimulating Factor Receptor*) yang terdapat pada makrofag [9]. Ikatan ini juga mampu mengakibatkan diferensiasi makrofag menjadi sel osteoklas[3]. Adanya peningkatan kadar sitokin-sitokin tersebut diduga mampu meningkatkan proses *Osteoclastogenesis* sehingga jumlah sel osteoklas akan meningkat dan resorpsi akan terus terjadi.

Berdasarkan beberapa uraian di atas, penulis tertarik melakukan penelitian mengenai perubahan peningkatan jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar tikus *Sprague dawley* yang mengalami distres kronis.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui terjadinya pengaruh lama distres kronis terhadap perubahan jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar tikus *Sprague dawley*.

Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan ialah penelitian *eksperimental laboratoris* dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium di Perumahan Gunung Batu Permai Jember dan Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada bulan November 2013 sampai Maret 2014.

Pada penelitian ini alat-alat yang digunakan antara lain kandang pemeliharaan dengan ukuran 35x40x60 cm, timbangan, *Electrical Foot Shock*, blade scalpel, gunting bedah, masker, *Stopwatch*, *handsocon*, cassette penyimpan jaringan, mikrotom, slide preparat, kuas, mikrotom, dan *cutter*. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus *Sprague dawley*, makanan dan minuman tikus yang beredar di pasaran yaitu

pakannya tipe BR2 dan PP3, chloroform, Alkohol bertingkat 100%, 95%, 90%, dan 70%, buffer formalin 10%, EDTA 15%, Poly-L-Lysin, parafin, aquadest steril, larutan PBS, xylol, dan larutan HE.

Sampel terdiri dari 32 ekor tikus *Sprague dawley* yang terbagi dalam 4 kelompok. Kelompok pertama terdiri dari 8 tikus yang tidak diberi paparan stresor renjatan listrik (hari ke-0), kelompok kedua terdiri dari 8 tikus yang dipapar stresor renjatan listrik selama 7 hari, kelompok ketiga terdiri dari 8 tikus yang dipapar stresor renjatan listrik selama 14 hari, dan kelompok keempat terdiri dari 8 tikus yang dipapar stresor renjatan listrik selama 28 hari.

Perlakuan stresor renjatan listrik diberikan dengan menggunakan alat *electrical foot shock* yang memiliki arus sebesar 2-8 mA dengan frekuensi dan sesi renjatan naik secara bertahap agar stres tidak mudah diadaptasi oleh tikus [5]. Tegangan sebesar 48 volt dengan frekuensi 0,5 Hz. Perlakuan diberikan maksimal pukul 09.00 karena pada saat itu hormon stres berada pada konsentrasi tertinggi dalam darah. Kandang perlakuan tikus berukuran 64 cm x 64 cm yang terdiri dari 8 kotak dan masing-masing kotak berukuran 16 cm x 16 cm. Namun untuk kandang pemeliharaan berukuran 35 x 40 x 60 cm yang terbagi menjadi 4 kotak. Tikus-tikus tersebut kemudian dikorbankan menggunakan *cloroform* untuk diambil rahang bawah regio molar 1 sampai 3 dan dilanjutkan dengan tahap pemrosesan jaringan.

Tahap pemrosesan jaringan terdiri dari beberapa tahap yakni 1) Tahapan fiksasi dengan menggunakan larutan buffer formalin 10% selama 24 jam. 2) Tahapan dekalsifikasi dengan menggunakan larutan EDTA 15% sampai tulang menjadi lunak namun tiap 2 hari sekali larutan EDTA 15% diganti dengan yang baru [10]. 3) Tahapan dehidrasi dengan memakai alkohol bertingkat secara berurutan yakni dimulai dengan alkohol berkonsentrasi 70% selama 15 menit, 80% selama 1 jam, 95% selama 2 jam serta alkohol 95%, 100% tiga kali masing-masing 1 jam. 4) Tahapan clearing menggunakan *xylol* 1 selama 1 jam dan *xylol* ke 2 dan 3 selama 2 jam. 5) Tahapan impregnasi dengan memakai parafin suhu 56⁰-60⁰C selama 3 kali, masing-masing 2 jam. 6) Tahapan *embedding* merupakan tahap akhir sebelum pemotongan jaringan yang bertujuan untuk penamaan jaringan ke dalam parafin. 7) Tahapan terakhir ialah pemotongan jaringan. Pemotongan jaringan dilakukan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5

mikron secara sagital dari regio molar 1 hingga molar 3.

Setelah itu jaringan diletakkan di atas permukaan air *waterbath* dengan temperatur tetap 56⁰-58⁰C sampai sayatan mekar. Lalu sayatan jaringan tersebut diletakkan di atas *glass object* yang telah dilapisi *polilysin* dan jaringan tersebut sudah siap diwarnai. Preparat tersebut dilakukan pengecatan menggunakan HE (*Haematoksin Eosin*) kemudian preparat diaplikasikan dilakukan pengamatan pada sel-selnya [11] [12].

Pada tahap pengamatan, dilakukan penghitungan sel osteoklas pada tulang alveolar dengan menggunakan perbesaran 400x sebanyak 5 lapang pandang yakni 2 lapang pandang daerah 1/3 servikal, 2 lapang pandang daerah 1/3 tengah, dan 1 lapang pandang daerah 1/3 apikal. Pengamatan dilakukan pada tepi tulang alveolar di daerah mesial dari gigi molar kemudian dirata-rata. Pengamatan ini dilakukan oleh 3 pengamat.

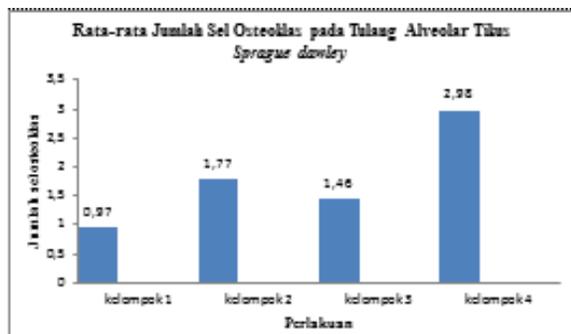
Hasil Penelitian

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan rata-rata jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar gigi molar tikus *sprague dawley* yang mengalami distres kronis dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Rata-rata Jumlah Sel Osteoklas pada tulang alveolar tikus *Sprague dawley* yang diberi stresor renjatan listrik

No	hari ke-0 (sel)	hari ke-7 (sel)	hari ke-14 (sel)	hari ke-28 (sel)
1	1.07	1.73	1.6	3.27
2	1.07	2	1.4	3.33
3	0.87	1.73	1.52	3.04
4	1	1.67	1.53	2.73
5	1	1.47	1.2	2.8
6	1	2	1,53	2,67
7	0,93	1,8	1,6	2,87
8	0,8	1,73	1,27	3,07
Mean	0.97	1.77	1.46	2.98
Standar Deviasi	0.09	0.17	0.15	0.25

Rata-rata perhitungan jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar tikus *Sprague dawley* yang mengalami peningkatan baik pada hari ke 7, 14, dan 28 dibandingkan dengan kelompok hari ke 0.



Gambar 1 Diagram batang rata-rata jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar tikus *Sprague dawley*

Berdasarkan data yang telah diperoleh kemudian dilakukan uji normalitas dengan *Kolmogrov smirnov test* dan uji homogenitas dengan *Levene test*. Hasil uji normalitas dan homogenitas dapat diketahui bahwa data terdistribusi secara normal dan homogen ($P>0.05$). Selanjutnya dilakukan uji *One Way Anova* dan uji lanjut *LSD*. Hasil dari kedua uji tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p<0.05$) pada rata-rata jumlah sel osteoklas tulang alveolar tikus *Sprague dawley* yang mengalami distres kronis dari setiap kelompok. Pada kelompok tikus yang diberi paparan stresor renjatan listrik diketahui rata-rata jumlah sel osteoklasnya lebih banyak dibandingkan perlakuan hari ke-0, yakni 1,77 sel pada perlakuan 7 hari; 1,46 sel pada perlakuan 14 hari; dan 2,98 sel pada perlakuan 28 hari, sedangkan untuk perlakuan hari ke-0 memiliki rata-rata sebesar 0,97 sel osteoklas.

Pembahasan

Osteoklas merupakan sel yang berperan penting dalam terjadinya resorpsi. Sel ini tampak berupa sel multinukleus besar dengan inti dapat mencapai 50 inti. Osteoklas ini biasanya terdapat pada lekukan-lekukan permukaan tulang yang biasa disebut dengan *Lacuna Howship* [13]. Sel ini memiliki enzim proteolitik dan sejumlah asam yang dapat melarutkan matriks organik dari tulang serta mampu memfagosit partikel kecil dari matriks dan kristal tulang sehingga mengakibatkan terjadinya resorpsi [14][15].

Terjadinya peningkatan jumlah sel

osteoklas pada tulang alveolar tikus yang diberi paparan stresor selama 7 hari ini diduga akibat pengaruh adanya peningkatan kortisol. Peningkatan kortisol ini diduga secara tidak langsung sebagai akibat dari peningkatan katekolamin. Pada kondisi distres kronis akan terjadi perangsangan sistem saraf simpatik sebagai respon tubuh terhadap stresor. Sistem saraf simpatis ini diduga mampu mengaktifkan penguatan hormon dalam bentuk pengeluaran katekolamin dalam jumlah besar-besaran [3]. Kondisi ini diketahui dapat mengakibatkan peningkatan sel-sel imun seperti halnya sel B, sel natural killers (NK), dan juga ditandai dengan peningkatan sitokin pro-inflamatori. α -adrenoreceptor adalah reseptor yang mengekspresi katekolamin yang juga bereperan sebagai reseptor dari sel B, sel NK, monosit/makrofag, dan neutrofil [16]. Respon dari α -adrenoreceptor sebagai akibat peningkatan katekolamin inilah yang diduga mampu memicu makrofag maupun sel lainnya untuk memproduksi sitokin-sitokin pro-inflamatori yakni interleukin (IL)-1, IL-2, dan TNF- α dalam jumlah besar [16].

Berdasarkan hasil penelitian, peningkatan kadar sitokin pro-inflamatori mampu mengaktifasi *hipotalamus pituitary adrenal* (HPA) axis. Pada saat hipotalamus teraktivasi maka akan terbentuk *corticotrophin releasing hormone* (CRH) kedalam sistem aliran darah portal hipotalamus-hipofisis. Proses ini akan merangsang produksi *adrenocorticotropic hormone* (ACTH) yang secara khusus bekerja pada korteks adrenal untuk menghasilkan hormon kortisol [17][7][18]. Hormon glukokortikoid ini berfungsi sebagai kontrol negatif terhadap sitokin yakni jika kortisol meningkat maka produksi sitokin akan diturunkan untuk menghindari terjadinya kerusakan pada tubuh [19]. Namun pada kondisi distres kronis dimana terjadi paparan stresor secara terus menerus sehingga hormon kortisol berada dalam konsentrasi tinggi memicu sel darah putih untuk menurunkan ekspresi ataupun fungsi dari reseptor glukokortikoid [17][7][19]. Kondisi ini mengakibatkan terjadinya penurunan aksi anti inflamasi yang mengakibatkan kadar sitokin menjadi tinggi.

Beberapa dari jenis sitokin yang mengalami peningkatan akibat beberapa mekanisme di atas ialah IL (*Interleukin*)-1, IL (*Interleukin*)-6, dan TNF (*Tumor Necrosis Factor*)- α . Beberapa peneliti terdahulu berpendapat bahwa ketiga sitokin tersebut mempunyai pengaruh langsung terhadap proses *Osteoclastogenesis* [9]. Dimana sitokin-sitokin tersebut dapat memicu ekspresi dari RANKL (*Receptor Activator of Nuclear kB Ligand*) yang merupakan kunci mediator pembentukan osteoklas serta diekspresikan oleh osteoblas berikatan dengan reseptornya RANK (untuk aktivator *Nuclear kB*) yang terdapat pada permukaan makrofag. Ikatan yang terbentuk antara RANKL-RANK dapat memicu diferensiasi makrofag menjadi osteoklas[3].

Pada TNF- α memiliki kelebihan jika dibanding dengan dua sitokin yang lain. Selain dapat meningkatkan ekspresi RANKL berikatan dengan reseptornya, sitokin ini juga mampu menstimulasi pembentukan M-CSF (*Machrophage Colony Stimulating Factor*). MCS-F ini diduga mampu menstimulasi pembentukan makrofag tanpa melibatkan RANKL-RANK [9]. Sehingga dari beberapa mekanisme tersebut dapat mengakibatkan peningkatan.

Pada hari ke 14 diketahui bahwa rata-rata jumlah sel osteoklas mengalami sedikit penurunan jika dibandingkan dengan hari ke 7 walaupun tetap lebih tinggi dari kelompok perlakuan hari ke 0. Kondisi ini diduga juga dipengaruhi oleh hormon kortisol. Berdasarkan data hasil penelitian yang dilakukan oleh Mustofa (2012) menunjukkan bahwa terjadi sedikit penurunan hormon kortisol dari hari ke 7 pada hari ke 14. Pada saat distress dimana terjadi peningkatan kadar katekolamin diduga mampu memicu peningkatan kadar sitokin pro-inflamatori dan juga kadar kortisol sebagai respon tubuh untuk memberikan feedback negatif agar peningkatan tidak terjadi secara terus-menerus [19]. Meningkatnya jumlah sitokin pro-inflamatori diduga mampu mengakibatkan peningkatan jumlah sel osteoklas yang mengakibatkan proses resorpsi tulang lebih aktif dibandingkan dengan keadaan normal. Proses resorpsi ini mengakibatkan terjadinya

pembongkaran kalsium yang ada pada tulang sehingga mengakibatkan kadar kalsium darah meningkat. Hormon kortisol diketahui mempunyai efek antagonis terhadap kalsium yakni mencegah proses penyerapan kalsium darah oleh tubuh, sehingga ketika kadar kalsium darah semakin tinggi maka kadar kortisol akan diturunkan [20].

Peningkatan jumlah sel osteoklas ini juga terjadi pada jaringan periodontal dalam rongga mulut yakni dalam tulang alveolar. Resorpsi tulang yang terjadi dapat mengakibatkan terjadinya periodontitis maupun kegoyangan gigi yang berujung pada kehilangan gigi akibat tulang alveolar yang merupakan penyangga gigi telah mengalami resorpsi [1]. Sejauh ini pada kondisi stres orang-orang tidak menyadari akan adanya penyakit tersebut, mereka beranggapan bahwa kasus kegoyangan gigi pasti disebabkan karena peradangan yang cukup parah pada bagian jaringan penyangga gigi. Akan tetapi yang perlu diketahui bahwa terjadinya periodontitis ini tidak hanya disebabkan karena adanya faktor lokal yakni invasi bakteri, dll. Akan tetapi kondisi stres juga dapat menjadi faktor predisposisi terjadinya periodontitis [22]. Salah satunya yaitu dengan memicu peningkatan produksi sitokin yang merupakan faktor yang dapat meningkatkan pembentukan osteoklas [23].

Simpulan dan Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa distress kronis yang didapatkan dari stresor kejutan listrik selama 7, 14, dan 28 hari dapat mengakibatkan perubahan pada peningkatan jumlah sel osteoklas pada tulang alveolar tikus *Sprague dawley*. Dimana jumlah sel osteoklas tertinggi tampak pada hari ke 28 dan terjadi sedikit penurunan pada hari ke 14 namun tetap lebih tinggi dari tikus yang tidak dipapar stresor kejutan listrik.

Saran dari penelitian ini adalah perlu diadakan penelitian lebih lanjut dengan menambahkan kontrol hari ke 7,14, dan 28, serta penelitian lebih lanjut dengan menghitung kadar kortisol dan katekolamin sehingga dapat diketahui dengan jelas pengaruh dari hormon tersebut. Selain itu perlu penelitian lebih lanjut

dengan daerah perhitungan yang lebih relevan serta perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pencegahan ataupun perawatan yang dapat diberikan untuk mengatasi peningkatan jumlah sel osteoklas pada kondisi distres

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada drg. Zahreni Hamzah M.S selaku ketua penelitian yang telah banyak memberikan berbagai dukungan sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan lancar.

Daftar Pustaka

- [1] Peruzzo, D.C., Benatti, B.B., Ambrosano, G.M., Nogueira, F.G.R., Sallum E.A., Casati, M.Z., et al. 2007. A Systematic Review of Stress and Psychological factors as possible risk factors for periodontal disease. *J Periodontol*, 78.
- [2] Kawuryan, F. 2009. *Tinjauan Faktor-Faktor Psikologis dan Sosial dalam Mempengaruhi Stres*. Kudus : Universitas Muria.
- [3] Sherwood, L. 2011. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Alih Bahasa : dr. Brahm U Pendit. Judul Asli : "Human Physiology : From Cells to Systems". Jakarta : EGC.
- [4] Guilliam, T.G., & Edwards, L. M.D. 2010. Chronic Stress and The Hpa Axis : Clinical Assesment and Therapeutic Considerations. *A Review of Natural & Nutraceuitcal Therapies for Clinical Practice*. 9 (2): 1-12
- [5] Mustofa, E. 2012. Efek Stres Fisik dan Psikologis pada Kortisol, PGE , BAFF, IL-21, slgA, dan Candidiasis 2 Vulvovaginal. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27.
- [6] Hokardi, C.A. 2013. "Pengaruh Stres Akademik Terhadap Kondisi Jaringan Periodontal dan Kadar Hormon Kortisol dalam Cairan Krevikular Gingiva". Tesis. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesian
- [7] Cohen, S., Deverts, D.J., Doyle, W.J., et al. 2011. *Chronic Stress, Glucocorticoid Rreceptor Resistance, Inflammation, and Disease Risk*. New York NY : The Rockefeller Unversity.
- [8] Bronner, F., & Marry, C.F.C. 2004. *Bone Formation*. United States of America.
- [9] Kanichiro, K., Takahashi, N., Jimi, E., et al. 2000. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*. 191: 275-86.
- [10] Muntaha, M.. 2001. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (H&E). Bogor : Balai Penelitian Veteriner.
- [11] Sudiana, I K. 1993. *Technik Praktis Untuk Jaringan Sel*. Bali : CV Dharma Sandi.
- [12] Lv, Xin , Qiang L., Shun W., Jing S., Min Z. & Yong-Jin C. 2012. Psychological Stress Alters The Ultrastructure and Increases IL-1 β and TNF- α in Mandibular Condylar Cartilago. *Braz J Med Biol Res*. 45 (10): 968-976.
- [13] Eroschenko, V.P. 2010. *Atlas Histologi diFiore*. Jakarta : EGC.
- [14] Sloane, E. 2004. *Anatomi dan Fisiologi untuk Pemula*. Cetakan I. Alih Bahasa oleh James Veldman. Jakarta: EGC.
- [15] Guyton and Hall. 2012. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran; Alih Bahasa: dr. Irawati Setiawan, dkk*. Jakarta : EGC.
- [16] Miller, A.H., Pearce, C.M., & Pearce B.P. 2000. Immune System and Central Nervous Interaction. *In Comprehensive Textbook of Psychiatry*, 7th ed. (ed. H.I Kaplan and B.J. Sadock), pp. 113-133. Lippiconts William and Wilkins: Philadelphia.
- [17] Miller, Gregory E., Sheldon Cohen, A. Kim Ritchey. 2002. Chronic Psychological Stress and the Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines: A Glucocorticoid-Resistance Model. *Am J Psychiatry*. 21 (6): 531-541.

- [18] Haddad, J.J., Saade, N.E. & Safish-Garbedian, B. 2002. Cytokines and Neuro-Immune-Endocrine Interactions: A Role For The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Revolving Axis. *J Neuroimmunol.* 133 (1-2): 1-19.
- [19] John, C.D & Buckingham, J.C. 2003. Cytokines: Regulation of Hipotalamus-Pituitary-Adrenal-Axis. *Curr Opin Pharmacol.* 3 (1): 78-84.
- [20] Kimberg, D.V, Baerg, R.D., Gershon, E.G., & Grandusius, R.T. 1971. Effect of Cortisone Treatment on The Active Transport of Calcium by The Small Intestine. *J Clin Invest.* 50: 1309.
- [21] William. 2008." Hubungan Stres dengan Penyakit dan Perawatan Peridontal ". Skripsi. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Sumatra Utara.
- [22] Sateesh C.P., Santhosh K.R. & Pushpalatha G. 2010. Relationship Between Stress and Periodontal Disease. *J Dent Sci Res.* 1 (1)
- [23] Chandna, S., & Bathla, M. 2010. "Stress and Periodontium: A Review of Concepts". *J Oral Health Comm Dent.* 4(Spl): 17-22.