

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**



**EKSPRESI PEPTIDA ANTIMIKROBA HUMAN BETA
DEFEN SIN -1,2,3 (HBD-1,2,3) SALIVA SEBAGAI
DETEKSI DINI KARIES**

TAHUN KE 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

**Dr. RETNO INDRAWATI drg., M.Si. (0012115903)
Prof. SENO PRADONO Ph.D., Sp.KGA(K) (0016075204)
TANTIANA., DRG., MKes (00066007)**

DIBIYAI OLEH :

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUAT RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR : 122/SP2H/PTNBH/DRPM//2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOPEMBER 2018**

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**



KKA
KK
LP 38/19
Ind
e

**EKSPRESI PEPTIDA ANTIMIKROBA HUMAN BETA
DEFENSIN -1,2,3 (HBD-1,2,3) SALIVA SEBAGAI
DETEKSI DINI KARIES**

TAHUN KE 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

**Dr. RETNO INDRAWATI drg., M.Si. (001211590 3)
Prof. SENO PRADIPO., S.U.Ph.D., Sp.KGA(K) (0016075204)
TANTIANA., DRG., MKes (00066007)**

DIBIYAI OLEH :

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUAT RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR : 122/SP2H/PTNBH/DRPM//2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOPEMBER 2018**



HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Ekspresi peptide antimikroba Human Beta Defensin -1,2,3 (HBD-1,2,3) Saliva sebagai deteksi dini karies

Peneliti/Pelaksana
 Nama Lengkap : Dr. drg RETNO INDRAWATI R, M.Si
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 NIDN : 0012115903
 Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 Program Studi : Kedokteran Gigi
 Nomor HP : 08165435601
 Alamat surel (e-mail) : retnoindrawati@fkg.unair.ac.id

Anggota (1)
 Nama Lengkap : SENO PRADOPO S.KG, Sp.K.G.A
 NIDN : 0016075204
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
 Nama Lengkap : TANTIANA S.KG, M.Kes
 NIDN : 0006066007
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
 Nama Institusi Mitra : -
 Alamat : -
 Penanggung Jawab : -
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 110,000,000
 Biaya Keseluruhan : Rp 207,500,000



Mengetahui,
 Wakil Dekan I FKG Unair
 (Prof. Dr. Anita Yulianti, drg., M.Kes)
 NIP/NIK 195807091985032001

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018
 Ketua,

(Dr. drg RETNO INDRAWATI R, M.Si)
 NIP/NIK 195911121987012001



Menyetujui,
 Ketua LPM Unair
 (Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si., PhD)
 NIP/NIK 196705071991021001

MILIK
 PERPUSTAKAAN
 UNIVERSITAS AIRLANGGA
 SURABAYA

RINGKASAN

Latar belakang : Deteksi seluruh spektrum karies gigi secara cepat dan akurat adalah alat penting untuk perencanaan dan evaluasi pelayanan kesehatan gigi dan mulut, karena metode deteksi karies dini, mendukung penilaian risiko karies gigi dimasa mendatang. Imunitas bawaan memainkan peran penting dalam melawan kolonisasi bakteri sebagai bagian dari pertahanan pelindung *host* terhadap karies gigi. Human Beta Defensin (HBD) 1,2 dan 3, merupakan peptida yang secara fisiologis disekresi dalam salivaguna mengatur keseimbangan flora mikroba rongga mulut dengan mengerahkan efek antimikroba langsung, untuk melindungi jaringan mulut terhadap infeksi mikroba. Human beta defensin (HBD) menunjukkan aktivitas kemotaktik untuk berbagai sel kekebalan bawaan, serta merangsang sel-sel lain untuk mensekresikan sitokin. **Tujuan penelitian tahun 1** adalah untuk menganalisis ekspresi peptida antimikroba HBD 1,2 dan 3 saliva, sebagai prediktor risiko karies gigi, **pada tahun ke 2** membuat Poliklonal antibodi HBD-1,2 dan 3 saliva sebagai bahan dasar prototip kit diagnostik karies gigi, **Metode Penelitian :** 45 siswa SD di PP qomaruddin bungah Gresik dipilih secara random, dibagi dalam 3 grup, 15 siswa dengan karies tinggi DMF-t ≥ 5 , 15 siswa dengan karies rendah DMF-t < 5 dan 15 siswa bebas karies sebagai kontrol, serta harus memenuhi kriteria inklusi. Sampel saliva dikumpulkan sebanyak 5 ml dengan metode Passive drool, menggunakan Salimetrics Saliva collection 10 ml, pada semua subyek sampel (45 subyek), setiap pasien dicatat OHI, DMF-t, BMI, saliva flow, pH dan level HBD-1,2 dan 3. Setelah dilakukan pengambilan sampel dan pencatatan, semua subyek sampel karies 30 siswa dilakukan terapi tumpatan dan 2 minggu pasca perawatan, dilakukan pengambilan saliva kembali. Seluruh sampel saliva yang terkumpul disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu -4°C , dibagi dalam beberapa aliquot dan disimpan dalam -80°C sampai dilakukan pengujian. Hasil sekresi HBD-1,2,3 pada grup karies pre dan pasca tumpatan serta BMI tinggi dan rendah diketahui dengan ELISA kit Nunc MaxisorpTM 96 sesuai protokol pabrik, hasil penelitian tahun kedua didapatkan poliklonal antibodi terhadap HBD-1,2 dan 3 yang saat ini akan digunakan untuk pembuatan prototipe diagnostik kit karies gigi dengan uji dotblot.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan berkatNya, sehingga kegiatan dan penyusunan laporan penelitian ini dapat kami selesaikan. **Penelitian tahun kedua** adalah implementasi hasil tahun pertama untuk membuat antibodi poliklonal pada hewan coba tikus wistar yang kemudian digunakan untuk merancang model prototipe depstik pada penelitian berikutnya

Pada kesempatan ini kami mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kepala kepada LPPM Universitas Airlangga yang telah memfasilitasi pengadakan, pengiriman proposal dan memberi wadah kepada kami untuk melakukan penelitian ini .
2. Rektor Universitas Airlangga beserta seluruh stafnya yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas dalam melakukan penelitian dan pengembangan ini
3. Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dalam melakukan penelitian ini.
4. Mahasiswa S-1 : Dien dan Tamima serta drg. Yosep dan drg Vian yang berkenan membantu dalam kolekting sampel.
5. dr. Mawar beserta staf dari Pokestren Pondok Pesantren Qomaruddin Bungah Gresik yang telah memberi kesempatan untuk pengambilan sampel saliva dari siswanya guna kelancaran penelitian ini.

Semoga Tuhan memberkati semua kebaikan yang telah diberikan kepada kami. Terima kasih atas kerjasamanya. Akhir kata, kami meyakini masih banyaknya keterbatasan dalam hasil penelitian ini yang diakibatkan karena berbagai kendala yang harus dihadapi dalam pelaksanaannya. Sehubungan dengan hal tersebut kami siap menerima masukan dan saran untuk kesempurnaan penelitian ini.

Surabaya, 10 Desember 2018

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|---------|
| LEMBAR PENGESAHAN..... | 1 |
| RINGKASAN..... | 2 |
| PRAKATA..... | 4 |
| DAFTAR ISI..... | 5 |
| BAB 1. PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang..... | 6 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 Saliva sebagai cairan diagnostik..... | 8 |
| 2.2 Peran saliva dalam proteksi karies..... | 9 |
| 2.3 Senyawa peptida anti mikroba..... | 9 |
| 2.4 Defensin..... | 10 |
| 2.5 Target AMPs pada membran mikroba..... | 12 |
| 2.7 Antibodi poliklonal..... | 13 |
| BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN | |
| 3.1 Tujuan..... | 14 |
| 3.2 Manfaat..... | 14 |
| BAB 4. METODE PENELITIAN | |
| 4.1 Kriteria Sampel..... | 15 |
| 4.2 Kriteria Inklusi..... | 15 |
| 4.3 Kriteria Ekkslusi..... | 15 |
| 4.5 Analisa Human Beta Defensin saliva..... | 16 |
| 4.6 Analisa Statistik..... | 16 |
| 4.7 Metode Tahun ke 2..... | 16 |
| BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI | |
| 5.1 Hasil..... | 19 |
| 5.2 Luaran..... | 19 |
| 5.3 Hasil Tahun ke 2..... | 20 |
| 5.4 Hasil Tahun ke 2..... | 25 |
| BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA..... | 26 |
| BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN | |
| 7.1 Kesimpulan..... | 27 |
| 7.2 Saran..... | 27 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 28 |
| Lampiran..... | 31 |





BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan nanoteknologi, diramalkan bahwa saliva memungkinkan menggantikan darah untuk mendiagnosa berbagai kondisi penyakit. Sejumlah temuan dalam dekade terakhir mendorong pentingnya penggunaan saliva sebagai sumber biomarker. Kadar hormon (misalnya kortisol, oksitosin) dan obat-obatan (misalnya cisplatin, nikotin, methadone) dalam saliva mencerminkan konsentrasi yang sama dalam serum. Sekarang telah diketahui terdapat 1166 protein saliva manusia, yang berfungsi dalam berbagai proses biologi. Beberapa penelitian yang telah dilakukan berfokus pada bagaimana teknologi baru dengan test sinyal hasil sampel saliva memberikan keadaan klinis suatu penyakit, dengan harapan membantu dokter mendiagnosis secara cepat serta akurat. Tahun 2004 deteksi HIV melalui saliva telah disetujui oleh Food and Drug Administration (FDA) (Kaufman E and Lamster IB, 2000).

Human Beta Defensin (HBD) dalam saliva berfungsi sebagai *Salivary Defense System* (SDS). Yang termasuk didalam SDS adalah kapasitas bufer, *Ca phosphate binding protein*, *immune surveillance* dan sekresi *Anti Microbial Peptides* (AMPs) (Tao 2005). *Anti Microbial Peptides* (AMPs) terutama ditemukan pada permukaan yang kontak dengan dunia luar, misalnya kulit, mata, permukaan usus, paru dan rongga mulut (Gilmore 2009). Yang termasuk AMP misalnya mucins, histatins, prolin kaya peptida, defensin, laktoferin, dan peroksidase yang mengatur flora mikroba mulut dengan mengerahkan efek antimikroba langsung, untuk melindungi jaringan mulut terhadap infeksi mikroba, virus, atau jamur. Pada manusia, AMP disintesa dan disekresi oleh sel epitel, sel system pertahanan host seperti netrofil, makrofak dan *natural killer cells* (NK cells), Mekanisme AMP sebagai antimikroba sampai saat ini belum diketahui secara lengkap, kemungkinan melalui cara perforasi dinding sel mikroba, kemudian peptide ini berinteraksi dengan *lipid bilayer* dan merusak strukturnya sehingga terjadi kematian (Dale 2006).

Defensin adalah peptida antimikroba. Pada manusia ada tiga subfamilies dari defensin, dibedakan oleh fitur struktural: α , β dan θ . Manusia memiliki enam α -defensin disebut Human Neutrofil Peptida 1 sampai 4 (HNP 1-4) dan Human Beta Defensin 5 dan 6 (HBD 5 & 6). HNP 1-4 dibuat dalam granulosit sementara HNP-5-6 yang dibuat dalam sel Paneth, yang ditemukan dalam kriptus dari usus kecil. Selain itu manusia juga memiliki β defensin disebut

Human β defensin 1 sampai 3 (HBD-1, 2 dan 3). Theta-defensin adalah peptida melingkar dan sampai saat ini belum dapat diisolasi pada manusia. Human Beta Defensin 1,2,3 (HBD 1,2,3), Human Neutrofil 1,3 (HNP1,3), laktoferin serta SIgA merupakan kelompok AMP yang tersekresi dalam saliva tujuan penelitian ini adalah mengungkap ekspresi HBD-1,2 dan 3 saliva pada penderita karis gigi sebelum dan setelah dilakukan perawatan karies, sebagai langkah awal pembuatan deepstick kit diagnose dini karies gigi untuk evaluasi klinis, prognosa dari kerusakan gigi serta untuk pengembangan teknologi pengobatan alternatif dan komplementer (*Complementary Alternatif Medicine*). Hal ini merupakan upaya dalam mendukung peningkatan pelayanan kesehatan dan meningkatkan kemampuan serta kemandirian teknologi kesehatan, maka pengembangan Iptek kesehatan ini diharapkan akan berdampak dalam peningkatan derajat kesehatan masyarakat secara nyata melalui teknologi intervensi, seperti tersedianya metode diagnosis dan pengobatan tepat guna, untuk mendukung tercapainya indonesia sehat 2025” dan program WHO (Buku Putih Penelitian Bidang Kesehatan Universitas Airlangga,2005-2025)

Tabel 1 Rencana Target Capaian Tahunan

| NO | Jenis Luaran | | Indikator Capaian | | | |
|----|-----------------------------------|---|-------------------|--------------|-----------|------|
| | | | TS ¹⁾ | TS+1 | TS+.. | TS+n |
| 1. | Publikasi Ilmiah | Internasional | draf | submit | accepted | |
| | | Nasional terakreditasi | submit | accepted | | |
| 2. | Pemakalah dalam temu ilmiah | Internasional | terdaftar | dilaksanakan | | |
| | | Nasional | dilaksanakan | dilaksanakan | | |
| 3. | Invited Speaker dalam temu ilmiah | Internasional | Tidak ada | Tidak ada | Tdk ada | |
| | | Nasional | terdaftar | dilaksanakan | | |
| 4. | Visiting lecturer | Internasional | Tidak ada | Tidak ada | Tdk ada | |
| 5. | Hak Kekayaan Intelektual (HKI) | Paten, paten sederhana, hak cipta, merk dagang, desain produk Industri, Indikasi geografis, perlindungan varietas tanaman, perlindungan topografi sirkuitterpadu. | Tidak ada | Tidak ada | terdaftar | |
| 6. | Tehnologi tepat guna | | Tidak ada | Tidak ada | Tdk ada | |

| | | | | | |
|----|---|-----------|-------------|-------------|--|
| 7. | Model/purwarupa/desain/karya seni/rekayasa sosial | Tidak ada | Tidak ada | Tdk ada | |
| 8. | Buku ajar (ISBN) | draf | Proses edit | terbit | |
| 9. | Tingkat kesiapan teknologi | draf | draf | Proses edit | |

BAB II TINJAUAN PUSTAKA



2.1 Saliva sebagai cairan dignostik

Saliva merupakan cermin dari tubuh karena dari saliva dapat dianalisa beberapa kelainan yang terjadi dalam tubuh. Pemilihan saliva sebagai cairan diagnostik karena dari saliva dapat dilihat beberapa komponen anorganik dalam bentuk ion seperti Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , fosfat dan komponen bioorganik berupa berbagai protein/peptida yang berfungsi melindungi jaringan mukosa rongga mulut, tetapi juga dapat menjadi petunjuk adanya kelainan atau penyakit lokal dan sistemik. Selama beberapa dekade para peneliti dibidang kesehatan rongga mulut telah menggunakan saliva sebagai salah satu sarana untuk mediagnose karies gigi melalui kapasitas bufer dan titer SIgA. Secara teoritis saliva dapat mempengaruhi proses terjadinya karies gigi karena flow saliva dapat menurunkan akumulasi plak pada permukaan gigi selain itu difusi komponen saliva seperti kalsium, fosfat, ion OH^- dan fluor dapat menurunkan kelarutan enamel dan meningkatkan remineralisasi gigi. Saat ini penggunaan saliva sebagai sarana diagnostik banyak diteliti untuk berbagai penyakit infeksi, sistemik maupun keganasan sampai dengan pemakaian obat-obat narkoba. Saliva merupakan *ultra filtrate plasma* terbukti dapat memberikan informasi seperti test yang diambil dari darah (Eliaz end Ira, 2002).

Upaya penelitian telah dilakukan untuk memanfaatkan xerostomia dan hypofungsi kelenjar saliva untuk mendiagnosa berbagai penyakit. Hormon steroid saliva dimanfaatkan untuk menilai kondisi ovarium selama masa fertilisasi secara invitro, memonitor terapi hormon pada wanita pasca menopause, mengevaluasi kesehatan dan perkembangan anak serta mempelajari mood dan perilaku emosional kognitif. Peningkatan jumlah beberapa marker saliva telah dikaitkan dengan kanker payudara dan ovarium. Saliva mendapat perhatian dalam beberapa tahun terakhir karena peranan potensialnya dalam mendiagnosa *helicobacter pylori*, patogen yang berkaitan dengan peptic ulcer. Saliva sebagai cairan tubuh dapat digunakan sebagai sarana deteksi pilihan maupun pendamping diagnostik karena

mempunyai keistimewahan dibandingkan dengan test darah, sebab dalam tehnik pengambilan saliva cukup aman, mudah, sederhana, dan dapat diambil berkali-kali (Marshall, 2003).

Saliva adalah sekresi yang kompleks, 93% dari volume disekresi oleh *major salivary gland* dan sisanya 7% oleh *minor salivary gland*. Saliva steril ketika meninggalkan kelenjar tetapi sampai di rongga mulut akan bercampur dengan *crevicular fluid*, sisa makanan, mikroorganisme, sel mukosa yang mengalami deskuamasi dll. Rata-rata sekresi saliva per hari 500 - 700 ml dan rata-rata volume didalam rongga mulut 1,1 ml. Pada keadaan istirahat sekresi berkisar antara 0,25 - 0,35 ml/min, dan sebagian besar disekresi oleh kelenjar submandibular dan kelenjar sublingual. Volume saliva terbesar adalah sebelum, selama dan setelah makan, mencapai puncak maksimum pada kurang lebih jam 12 siang dan sangat menurun pada malam hari selaa tidur. 99% dari saliva adalah air dan 1% lainnya molekul organik dan anorganik (Llena, 2006).

2.2 Peran saliva dalam proteksi karies

Peran saliva dalam proteksi terhadap karies terdiri dari 4 aspek yaitu : 1). *diluting* (mengencerkan) dan mengeliminasi gula atau bahan lain 2). *kapasias bufer* 3). *balancing* demineralisasi dan remineralisasi 4). *antimicrobial action*. Saliva mempunyai peran penting didalam menjaga keseimbangan ekosistem rongga mulut. Hal ini merupakan dasar untuk mengontrol karies. Saliva mampu berfungsi menyeimbangkan mikrobiota rongga mulut oleh karena didalam saliva mengandung protein-protein tertentu yang merupakan unsur pokok dari *acquired pellicle*, membantu agregasi bakteri dan memiliki efek antibakteri oleh karena beberapa diantaranya mampu memodifikasi metabolisme bakteri dan mampu melekat pada permukaan gigi. Protein penting yng terlibat didalam menjaga ekosistem adalah defensin, lactoferin, lysozyme, peroxidases, aglutinin, histidin, SIgA , IgG dan IgM. (Marshall, 2003).

2.3 Senyawa Peptida Antimikroba

Senyawa peptida antimikroba (*Antimicrobial Peptide*, AMP) adalah senyawa dengan bobot molekul rendah baik berupa protein atau peptida pendek yang memiliki aktivitas menghambat atau membunuh mikroba (antimikroba). AMP merupakan molekul kofaktor dalam sistem pertahanan tubuh dan sistem imunitas terhadap infeksi (Yeaman *et al.*, 2005). Adanya perbedaan pada sel mikroba dan mamalia menjadi dasar selektifitas kerja AMP. Perbedaan tersebut meliputi komposisi dan struktur membran, energi potensial dan polarisasi transmembran, serta struktur sterol, lipopolisakarida (LPS) dan peptidoglikan (Epanand *et al.*,

1999). Keseimbangan interaksi elektrostatik dan hidrofobisitas AMP dengan sel targetnya menjadikan AMP bersifat toksisitas selektif. AMP membentuk struktur amfipatik (mengandung bagian hidrofil dan bagian hidrofob) dan bersifat kationik pada pH fisiologi (Hancock *et al.*, 1999). Senyawa ini memiliki struktur dan urutan asam amino yang beragam, sehingga efektif dalam mencegah atau menghambat resistensi (Marshall, 2003).

Umumnya molekul AMP mempunyai mekanisme kerja yang kompleks dan tidak identik. Selain menjadikan membran luar sel sebagai target, AMP juga menjadikan komponen di dalam sitoplasma sebagai target. Penggunaan AMP dalam bidang pengobatan sangat potensial, karena AMP dapat merekonstruksi sel target dan memiliki kemampuan antimikroba yang lebih kuat dibanding antibiotik biasa. Senyawa AMP dapat (Yeaman *et al.*, 2005) :Meregulasi sel target untuk memodifikasi struktur di luar selnya agar lebih sensitif terhadap antibiotik, mengatasi resistensi, bekerja secara non-kompetitif dengan antibiotik biasa (Paris 2009).

AMPs merupakan komponen dasar pertahanan innate immunity (Bals R, 2000; Tollin M, et al., 2003). Peptide dengan aktifitas antimikroba ini pertama digambarkan oleh Zeya dan Spitznagel pada tahun 1996 dan diberi nama defensin karena berfungsi sebagai pertahanan host. Sejak itu beberapa peptide yang lain dengan efek antimikroba yang mirip ditemukan dan dikarakteristik menggunakan metode penelitian biologi molekuler dan genetic molekuler (Sorensen OE, 2008).

AMPs mempunyai aktifitas sebagai antibiotik endogenus dengan cara merusak langsung pada mikroba. Selain berfungsi antimikroba juga mempunyai fungsi yang lain. AMPs merupakan polipeptida yang mengandung sedikitnya 100 residu asam amino (Ganz T and Lehrer RI, 1995). Mempunyai aktifitas spectrum yang luas terhadap bermacam-macam mikroba termasuk bakteri Gram positif, Gram negatif, fungi, parasit, virus dan sel-sel tumor (Suttmann H, 2008). Daya antimikroba dari AMPs ditentukan berdasarkan urutan asam amino strukturnya. Pada manusia, beberapa tipe sel mensintesa dan mensekresi AMPs, seperti sel epitel dan sel-sel system pertahanan host seperti netrofil, makrofak dan *natural killer cells* (NK cells) (Powers JP and Hancock RE, 2003).

2.4 Defensin

Defensin adalah peptida kationik kecil yang kuat dengan rantai tunggal dengan berat molekul 34 kDA. Dapat membunuh bermacam bakteri Gram positif dan Gram negatif, *fungi* dan juga *enveloped virus* seperti herpes simplex. Diklasifikasikan kedalam α dan β defensin

berdasarkan pada sekuen ketiga ikatan disulfida intermolekuler. Defensins secara struktur merupakan *small cationic* dan *cystein rich peptide* dengan berat molekul antara 3 dan 5 kDa (Verma et al., 2007), dengan ciri-ciri adanya struktur β sheet yang dihubungkan dengan tiga ikatan disulfide yang dibentuk 6 residu cystein (Yang, et al., 2002). α defensin terdiri dari 29- 35 asam amino dan susunan cysteinenya adalah C1- C6, C2- C4, dan C3- C5, sedangkan β defensin terdiri dari 38- 42 asam amino yang menghubungkan C1- C5, C2- C4, dan C3- C6 (Yang, et al., 2002). Alpha (α) defensin diekspresi didalam neutrofil dan intestinal Paneth cell (Yoshihiro A, 2005). Pada umumnya defensin disekresi didalam cairan biologis termasuk urine, *bronchial fluid*, *nasal secretion*, saliva dan gingival crevicular fluid (GCF), dimana peptida ini menunjukkan pola ekspresi *subtype* yang spesifik. Beta-defensin 1 diekspresikan secara konstitutif, sedangkan Beta-defensin 2 (BD-2) dan Beta-defensin 3 (BD-3) ekspresinya dapat diinduksi oleh bakteri, interleukin-1 (IL-1) atau tumor necrosis factor- α (TNF- α). Walaupun HBD-2,3 diinduksi dan diekspresikan hanya selama ada inflamasi di jaringan epitel, tetapi di rongga mulut juga diekspresikan pada jaringan epitel yang sehat, secara klinis jaringan gingivanya tidak mengalami inflamasi (Eberhard J, 2009)

Alfa defensin konsentrasinya sangat tinggi pada granula netrofil (PMNs) atau sel paneth dari usus, sedangkan β defensin disekresi oleh epitel permukaan mukosa, termasuk populasi sel yang ditemukan pada mata, kulit, mukosa rongga mulut, system urogenital dan pernafasan. Pada manusia α defensin, human neutrophil peptide (HNP) 1- 4 diekspresikan dalam netofil serta limfosit dan monosit (Algerberth, 2000). Serta pada natural killer cells (sel NK) (Kalifour, 2004). Sedangkan human defensin (HD) 5- 6 terutama terekspresi pada sel paneth (Mallow, 1996). Produksi HNP 1-3 mungkin merupakan upregulation dari *proinflammatory cytokine*. Peran IL-1 β , IL-6, dan TNF α , pada produksi HNP 1-3 dalam *immature monocyte derived DCs* (iMDDCs) dan hasil mengindikasikan bahwa IL-1 β dapat menginduksi dengan upregulation dari HNP 1-3 dalam iMDDCs (Rodriguez G et al., 2007). Jalur *signaling* masih belum jelas, tetapi penelitian menunjukkan bahwa nucleotide binding oligomerization domain (NOD2) dapat menginduksi sekresi HNP1 (Yamamoto F et al., 2010)

Human Beta defensin (HBDs) adalah peptida antimikroba kation yang berasal dari sel epitel. Peptida antimikroba ini telah diidentifikasi sebagai komponen penting didalam *innate host defense* dan mempunyai kontribusi didalam menjaga kesehatan pada pertahanan mukosa. BDs merupakan famili dari peptida kation (4 -5 kDa) berasal dari epitel yang menunjukkan sifat sebagai antimikroba dan imunomodulator. Disamping kedua sifat tersebut BDs dapat meningkatkan *adaptive immunity* dengan cara berperan sebagai *chemoattracting* sel T, sel

dendrit imature, sel B, neutrofil dan makrofag (Ghosh SK.,2007) .Tiga Beta defensin yaitu Human Beta defensin-1 (HBD-1), Human Beta defensin-2 (HBD-2) dan Human Beta defensin-3 (HBD-3) berbeda regulasinya didalam *oral keratinocyte*. HBD-1 diekspresikan secara konstitutif didalam *oral keratinocyte*, sementara HBD-2 dan HBD-3 diregulasi karena distimuli oleh produk bakteri atau bakteri dan *proinflammatory stimuli* seperti interleukin 1β ($IL-1\beta$), *tumor necrosis factor α* ($TNF-\alpha$) dan interferon γ ($IFN-\gamma$) (Yoshihiro 2007). Epitel rongga mulut mampu membedakan mikroorganisme komensal dan mikroorganisme patogen. *Immune response signaling* terhadap bakteri komensal dan bakteri patogen mekanismenya berbeda, demikian juga terhadap ekspresi HBD-2. Oleh karena bakteri komensal merupakan *Excellent inducers* dari HBD-2 didalam sel epitel rongga mulut, maka penemuan ini menyarankan bahwa komunitas bakteri komensal rongga mulut berperan didalam meningkatkan *innate immune* dari epitel rongga mulut (Dale BA 2007). Mikroorganisme yang berperan penting didalam etiologi karies gigi adalah oral streptococci terutama *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) dan *Streptococcus sobrinus* (*S.sobrinus*) (Andrea 2008). Dua spesies bakteri tersebut dilaporkan peka terhadap BD-2. Hal ini mengindikasikan bahwa peptida ini merupakan agen terapeutik yang potensial terhadap pencegahan karies gigi (Nishimura 2004).

2.5 Target AMPs pada membran mikroba

Aspek penting fungsi dari AMPs adalah kemampuannya secara spesifik pada sel- sel microbial tidak dipengaruhi oleh sel host. Daya tarik elektostatika antara AMPs dengan membrane mikroba adalah sesuatu yang sangat penting. Muatan pasitif dari AMPs mudah berinteraksi dengan muatan negative dari dinding sel mikroba (Diamond G, et al., 2009; Schneider JJ, et al., 2005; Pazgier M, et al., 2006; Hanzler Wildman KA, 2003; Zasloff M, 2003). Secara keseluruhan muatan negatif dari dinding sel bakteri ini merupakan hasil dari muatan negatif fosfolipid dalam membrane bakteri tetapi juga dari muatan negatif lipopolisakarida dalam gram negatif dan CWGs pada dinding sel bakteri gram positif (Schneider JJ, et al., 2005). Penelitian *invivo* secara selektif pada mikroba terhadap AMPs yang menggunakan label radioaktif AMPs pada hewan coba yang membandingkan lesi yang disebabkan oleh bakteri dan jamur pada mice dan kelinci yang diinduksi inflamasi menunjukkan secara signifikan adanya akumulasi AMPs yang lebih banyak pada lesi terinfeksi oleh mikroba. Ini mengindikasikan bahwa secara *invivo* AMPs mampu membedakan antara sel mikroba dan host (Welling LL, et al., 2001).

2.6 Antimicrobial properties of Saliva

| Antimicrobial agent | Activity |
|--------------------------------|---|
| Secretory IgA (also sIgG,sIgM) | Inhibits adherence. Agglutinates bacteria. Virus neutralisation. IgA is the major antibody in saliva |
| Defensin | Effective against <i>S.mutans</i> |
| Lactoferrin | Iron binding. Bacteriostatic |
| Lysozyme | Effective against <i>S.mutans</i> |
| Agglutinins | Glycoproteins, mucins, fibronectin, 2-microglobulin, histatin, proline-rich protein |
| Myeloperoxidase system | Bactericidal in presence of thiocyanate/halide- H_2O_2 |
| Salivary peroxidase system | (enzyme-thiocyanate- H_2O_2) |
| Complement (trace amounts) | C3 probably largely derived from gingival crevicular fluid |
| Leukocytes | >98% are neutrophil, but up to 50% may not be capable of phagocytosis |

Dikutip dari : Walker, 2004. Oral Mucosal Immunology, vol.33 no.4 ; 27 - 30

2.7 Antibodi poliklonal

Antibodi poliklonal digunakan secara eksperimental dalam kedokteran klinis untuk berbagai alasan. Persiapan poliklonal umumnya lebih mudah dan lebih murah untuk dihasilkan daripada antibodi monoklonal, dan juga mampu bertahan pada berbagai rentang variasi suhu dan PH yang lebih besar. Mengenali lebih banyak epitop melalui tahap melisis sel untuk mengeluarkan protein yang diinginkan dari sel. Bila yang diinginkan adalah sebuah protein yang terfosforilasi, maka perlu ditambahkan inhibitor fosfatase agar gugus fosfat pada protein tersebut tidak dibuang.

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan:

Penelitian tahun 1 adalah untuk menganalisis ekpresi peptida antimikroba HBD 1,2 dan 3 saliva, sebagai prediktor risiko karies gigi,

Penelitian tahun ke 2 Membuat Poliklonal antibodi HBD-1,2 dan 3 saliva sebagai bahan dasar prototip kit diagnostik karies gigi

3.2. Manfaat

Mendiagnosa karies dengan menggunakan kadar peptida anti mikroba HBD 1,2,3 dalam saliva sebagai innate immunity dapat dipertimbangkan untuk membantu mendiagnosa lesi karies secara dini dimasa mendatang, karena kebutuhan akan jenis perawatan yang tepat untuk seorang pasien sangat bergantung pada status kesehatan yang bersangkutan, serta keakuratan diagnosa.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Kriteria Sampel

Sampel penelitian adalah semua saliva yang diambil dari siswa Sekolah dasar, bebas karies maupun yang menderita karies gigi aktif, di pp Qomaruddin Bungan Gresik dengan randomisasi, sehingga didapatkan jumlah sampel 50 siswa, yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi

4.2 Kriteria inklusi : adalah kriteria yang memenuhi syarat variable penelitian, yaitu:

1. Siswa laki- laki atau perempuan umur 10 sampai 12 tahun.
2. Bebas karies atau karies sesuai dengan kelompok yang ditentukan dengan DMF-t ≥ 5
3. Keadaan umum siswa dinyatakan sehat, pada saat diambil sampel serta berdasarkan data dari kuesioner.
4. Siswa tidak sedang mendapat pengobatan yang dapat menekan respons imun

4.3 Kriteria eksklusi :

Subyek karies dan bebas karies sedang menjalani pengobatan dengan kortikosteroid atau immunosupresif yang lain dalam satu bulan terakhir, malnutri berat, penyakit sistemik yang dapat mengganggu sistem imunologis humoral dan mukosal, kesehatan rongga mulut jelek dan sedang dilakukan perawatan orthodontia.

4.4. Pengambilan sampel saliva

50 siswa SD di PP qomaruddin bungah Gresik dipilih secara random, dibagi dalam 2 grup, 25 siswa dengan karies aktif dan 25 siswa bebas karies sebagai kontrol, dan harus memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Pengambilan sampel saliva pada subyek karies dan bebas karies dilakukan dengan cara, subyek diinstruksikan untuk menggosok gigi dan makan pagi, selanjutnya tidak boleh makan dan minum selama 1 jam sebelum diambil salivanya. Subyek duduk, kepala dimiringkan sedikit ke depan, saliva ditampung dalam Salimetrics Saliva collection sampai didapat 5 ml. pelaksanaan pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari antara jam 9.00–11.00 dengan metode Passive drool, setiap pasien dicatat OHI, DMF-t, BMI, saliva flow, pH dan level HBD-1,2 dan 3. Setelah dilakukan pengambilan sampel dan pencatatan, semua subyek sampel karies 25 siswa dilakukan terapi tumpatan. 2 minggu post perawatan (25 siswa dengan karies gigi). Dilakukan pengambilan saliva kembali.

Seluruh sampel saliva yang terkumpul disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit pada suhu -4°C , dibagi dalam beberapa aliquot dan disimpan dalam -80°C sampai dilakukan pengujian. Hasil sekresi HBD-1,2,3 pada grup sebelum tumpatan dan sesudah tumpatan diukur dengan ELISA kit Nunc Maxisorp™ 96 sesuai protokol pabrik

4.5. Analisis Human beta defensin saliva

sampel saliva digunakan untuk mengukur tingkat HBD dengan tes enzyme-linked immunosorbent (ELISA). dilakukan sesuai dengan petunjuk pabrik, Sandwich ELISA tes untuk HBD-1,2 dan HBD-3. Nunc Maxisorp™ 96 lubang pada plate dilapisi dengan 100 ml capture antibodi semalam. Antibodi capture yang digunakan adalah 2 mg / ml anti-HBD-1,2 dan 3. lubang pada plate diblokir dengan 300 ml dari 1% bovine serum albumin (BSA) di phosphate buffered saline (PBS) selama 1 jam dan diinkubasi dengan standar peptida rekombinan dan sampel air liur selama 1 jam. Standar dan sampel air liur diencerkan dalam pengencer sampel (0,05% Tween-20, 0,1% BSA, 300 mM MgCl_2 di PBS) dan diuji dalam rangkap tiga. kation divalen yang ditambahkan ke sampel pengencer untuk mengatasi efek saliva masking peptida tersebut. Setelah inkubasi sampel, masing -2 lubang pada plate diinkubasi dengan 100 ml antibodi selama 1 jam, HRP konjugat selama 30 menit dan 2,2'-Azinobis (asam 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonat) (ABTS) substrat cair (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Optical density (OD) pembacaan yang dibaca pada panjang gelombang 405-650 nm. Masing-masing. konsentrasi total protein dalam sampel saliva diukur menggunakan asam bicinchoninic (BCA) assay protein ,sesuai dengan instruksi pabrik

4.6 Analisa statistik

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan dua-sample t-test. A non-parametrik Wilcoxon rank-sum test digunakan ketika asumsi data terdistribusi normal menjadi tidak sah dengan uji Shapiro-Wilks. analisis korelasi dilakukan dengan menggunakan uji korelasi Pearson dan Spearman uji korelasi rank. Untuk semua tes, kriteria untuk signifikansi statistik adalah p-nilai ≤ 0.05 .

4.7 Metode Tahun ke 2

Western blot ekstrak HBD1,2 dan 3 saliva dari grup penderita karies dan bebas karies, Hasil elektroelusi HBD1,2 dan 3 tahun 1 dimasukkan dalam selofan digunakan sebagai antigen. Hewan coba kelinci jawa (*Lepus negricollis*) secara random dibagi dalam 3 grup masing-2 sejumlah 7 ekor disimpan di kandang. Setelah 7 hari aklimatisasi terhadap

lingkungan dengan diet pellet dan air dan diamati untuk tanda-tanda penyakit. sampel darah kelinci pra-imun (1-3 ml) diambil sebelum imunisasi pertama dari auricular arteri pusat menggunakan jarum suntik. Kelinci ditempatkan dalam kotak penahanan kelinci dan telinga diusap dengan alkohol. Salep anestesi (yaitu Lanocaine) kemudian digosok pada kulit di atas arteri. Setelah 5 menit atau lebih telinga kembali diusap dengan alkohol untuk mendisinfeksi dan menghapus bius yang tersisa. Kemudian kelinci diberi imunisasi primer (antigen HBD) dalam 1ml volume emulsi PBS dan complete Freund Adjuvant, secara subkutan di 5 lokasi dengan dosis 100 μ g antigen. Setelah hari ke 28 serum dipanen, kemudian diteruskan injeksi antigen dengan ditambah incomplete freud ajuvan di 2 lokasi sampai 6 hari, setelah itu dipanen serumnya setiap hari hingga 5 hari. Titer antibody poliklonal di periksa dengan ELISA. Hasil antibodi poliklonal dianalisis immunoassay menggunakan metode dot blot dan SDS PAGE intrepetasi data kuantitatif dengan Corel. Pembuatan prototip depstik (Dipstick adalah strip reagen berupa strip plastik tipis yang ditempli kertas seluloid yang mengandung bahan kimia tertentu sesuai jenis parameter yang akan diperiksa. Saliva Dip merupakan analisis kimia cepat untuk mendiagnosa prognosa karies gigi. Uji kimia yang tersedia pada reagen strip adalah : protein (HBD1,2,3), pH, kapasitas buffer.

BAB 5

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil Tahun 1

Hasil 1. Telah diikuti dalam seminar Internasional IMEDITEC 2017 pada tanggal 6-7 September di Johor Malaysia dengan judul **“Increasesd levels of Human Beta Defensin chils with dental caries”**

hBD-1,2 dan 3 kelompok karies dan bebas karies diuji untuk Uji Normalitas Satu Sample Kolmogorov-Smirnov, untuk mengetahui apakah data yang diperoleh terdistribusi normal. Pada setiap kelompok sampel (Karies Gigi n = 33 dan Bebas Karies n = 22), nilai signifikansi $p > 0,05$ maka semua kelompok data penelitian terdistribusi normal. Tingkat saliva rata-rata hBD1, hBD2 dan hBD3 untuk kelompok bebas karies (n = 22) adalah $0,86 \mu\text{g} / \text{ml}$, $1,76 \mu\text{g} / \text{ml}$ dan $1,88 \mu\text{g} / \text{ml}$ dan untuk kelompok karies (n = 33) adalah $5,26 \mu\text{g} / \text{ml}$, $4,25 \mu\text{g} / \text{ml}$ dan $4,85 \mu\text{g} / \text{ml}$. Artinya, tingkat hBD1, hBD2 dan hBD3 berkorelasi dengan pengalaman karies secara signifikan ($p < 0,01$). PH air liur pada pasien kelompok karies lebih asam (6,0 - 6,5) dibandingkan dengan pH kelompok bebas karies (6,9 - 7,0)

HBD-1

Merupakan sebagian penelitian kolaborasi dengan mahasiswa S-1 FKG Unair dan telah dipresentasikan pada Seminar Internasional di APDSA Malaysia 6-9 Juli 2018 dan menjadi **juara I**

Tabel 5.1 Rerata DMF-T/def-t dan konsentrasi HBD-1 saliva pada masing-masing kelompok

| SAMPSEL | DMF-T/def-t | Konsentrasi HBD- |
|-------------------------------|-----------------|---------------------|
| | Mean \pm SD | Mean \pm SD |
| Kelompok 1 (bebas karies) | 0 | 1000.8 \pm 339.38 |
| Kelompok 2 (karies rendah) | 1.86 \pm 0.83 | 1036.8 \pm 366.9 |
| Kelompok 3 (karies tinggi) | 7.80 \pm 2.68 | 709.93 \pm 243.30 |

Sampel bebas karies sebagai kontrol menunjukkan bahwa pada penelitian ini diperoleh indeks DMF-T/def-t= 0 (bebas karies) dengan rerata konsentrasi HBD-1 saliva sebesar $1000.8 \pm 339.38 \text{pg/ml}$. (Tabel 5.1)

Sampel indeks DMF-T/def-t rendah menunjukkan bahwa pada penelitian ini diperoleh rerata indeks DMF-T/def-t= 1-3 (karies rendah) sebesar 1.86 ± 0.83 dengan rerata konsentrasi

bahwa pada penelitian ini diperoleh sebesar 7.80 ± 2.68 dengan rerata konsentrasi HBD-1 sebesar $709.93 \pm 243.30 \text{ pg/ml}$.

Sebelum dilakukan uji kadar HBD-1 saliva, data yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas terhadap data hasil penelitian. Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. (Tabel 5.2)

Tabel 5.2 Hasil uji Spearman's

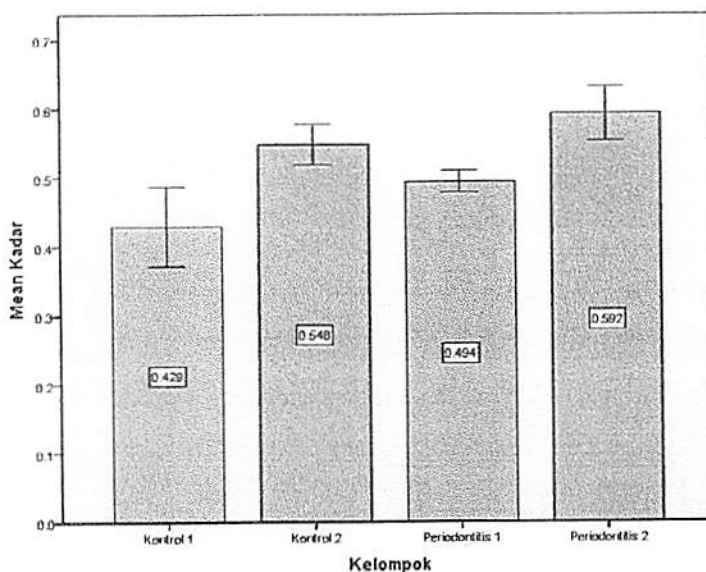
| uji Spearman | DMF-T/def-t | Konsentrasi | p |
|--------------|-------------|-------------|-------|
| DMF | 1.000 | -0.451 | 0.002 |
| Konsentrasi | -0.451 | 1.000 | |

Hasil uji *Kolmogorov-Smirnov* menunjukkan probabilitas masing masing kelompok perlakuan, yaitu kelompok bebas karies nilai dari sampel Kelompok 1 DMF-T/def-t= 0 (bebas karies) $< \alpha (0,5)$ maka distribusi data DMF-T/def-t konstan. Sedangkan nilai dari sampel kelompok 2 pada DMF-T/def-t= 1-3 (karies rendah) dan kelompok 3 DMF-t/def-t= > 6 (karies tinggi) dari data konsentrasi $> \alpha (0,5)$ maka distribusi data konsentrasi normal. Nilai p (0.002) $< \alpha (0,05)$ menunjukkan bahwa nilai DMF-T/def-t pada konsentrasi HBD-1 saliva berkorelasi secara signifikan. Nilai $r < 0$ menunjukkan bahwa korelasi antara DMF-T/def-t dan HBD-1 saliva berhubungan terbalik, yang artinya DMF-T/def-t rendah memiliki kadar HBD-1 saliva pada konsentrasi yang meningkat, sedangkan DMF-T/def-t tinggi memiliki kadar HBD-1 saliva pada konsentrasi yang rendah

HBD-2

Merupakan sebagian penelitian kolaborasi dengan mahasiswa PPDGS FKG Unair telah dipresentasikan pada Seminar Internasional APSP di Seoul tanggal 22 sd 24 September 2017 dengan judul "**Evaluating Human Beta Defensin-2 in patients with chronic periodontal whether treatment affected this process** "

Uji T berpasangan dilakukan dengan $p = 0,001$ yang berarti secara statistik ada perbedaan yang signifikan ($p < 0,005$) untuk kadar HBD-2 pada pasien sebelum dan sesudah pengobatan dan tingkat HBD-2 lebih tinggi pada kelompok periodontitis dibandingkan kelompok kontrol. (gambar 1 : Grafik skor HBD-2 pada masing-2 kelompok)



HBD-3

Merupakan sebagian penelitian kolaborasi dengan mahasiswa S-1 dan telah dipresentasikan pada **Seminar Internasional 7th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, tanggal 29 sd 30 Maret 2018**

Kelompok (1) Bebas karies dengan BMI ≤ 15 kg/m² sebanyak (n=14); (2) Bebas karies dengan BMI ≥ 16 kg/m² sebanyak (n=14); (3) Berkaries DMF ≥ 3 dengan BMI ≤ 15 kg/m² sebanyak (n=17); (4) Berkaries DMF ≥ 3 dengan BMI ≥ 16 kg/m² sebanyak (n=17).

Tabel 5.3. Rerata dan simpangan baku kadar HBD-3 masing-masing kelompok.

| Kelompok sampel | Kadar HBD-3 |
|------------------------------|--------------------|
| | $X \pm SD$ (ng/ml) |
| Kelompok 1 (bebas Karies) | 3.366 ± 0.892 |
| Kelompok 2 (bebas Karies) | 2.941 ± 0.772 |
| Kelompok 3 (Karies) | 3.262 ± 0.742 |
| Kelompok 4 (Karies) | 2.579 ± 0.636 |

Tabel 5.4. Rerata dan simpangan baku skor BMI dan kadar HBD-3 untuk kelompok bebas karies dan berkaries.

| Kelompok sampel | Skor BMI $X \pm SD$ (kg/m^2) | Kadar HBD-3 $X \pm SD$ (ng/ml) |
|------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Bebas Karies (Kelompok 1 dan 2) | 17.46 ± 3.60 | 3.153 ± 0.847 |
| Berkaries (kelompok 3 dan 4) | 17.05 ± 4.24 | 2.920 ± 0.764 |

Data hasil kadar HBD-3 pada keempat kelompok dilakukan uji normalitas dengan uji *One-Sample Komogorov-Smirnov* yang ditunjukkan tabel 3. Pada hasil uji normalitas didapatkan hasil $p > 0.05$ pada semua kelompok yang berarti semua data kelompok penelitian berdistribusi normal. Uji homogenitas selanjutnya dilakukan dengan uji Levene untuk melihat varians data, dari hasil uji didapatkan $p > 0.05$ untuk keempat kelompok sampel yang menunjukkan bahwa varians data homogen (tabel 5.5).

Tabel 5.5. Hasil uji normalitas kadar HBD-3 pada kelompok sampel.

| Kelompok sampel | Sig. (p) |
|-----------------|----------|
| Kelompok 1 | 0.20 |
| Kelompok 2 | 0.20 |
| Kelompok 3 | 0.20 |
| Kelompok 4 | 0.20 |

Tabel 5.6. Hasil uji Levene

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. (p) |
|------------------|-----|-----|----------|
| .412 | 3 | 58 | .745 |

Hasil varians data yang homogen memenuhi syarat untuk selanjutnya dilakukan uji t sampel independen

untuk melihat perbedaan kadar HBD-3 antara kelompok 1 dan 2, serta antara kelompok 3 dan 4

Diperoleh $p=0.189$ sehingga $p>0.05$, berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kadar HBD-3 kelompok 1 dan 2. Pada kelompok 3 dan 4 didapatkan nilai $p<0.05$ yakni $p=0.007$ yang berarti ada perbedaan yang signifikan pada kedua kelompok ini.

Tabel 5.7 Hasil signifikansi uji t sampel independen.

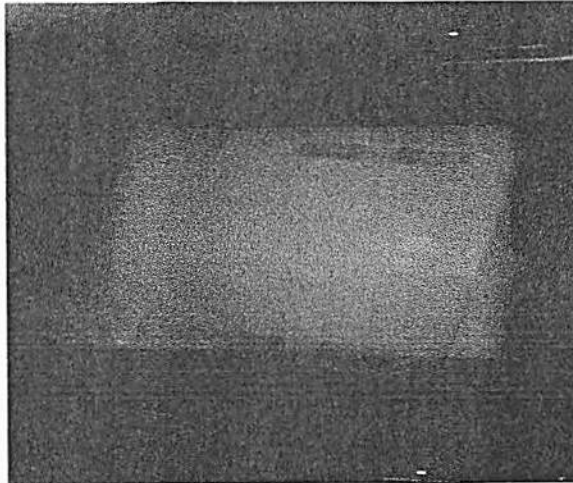
| | Kelompok 1 | Kelompok 2 | Kelompok 3 | Kelompok 4 |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Sig. (p) | 0.189 | | 0.007 | |

Pada kelompok bebas karies dan berkaries dilakukan uji normalitas *One-sampel Komogorov-Smirnov* untuk melihat distribusi data. Kelompok bebas karies ataupun berkaries didapatkan nilai signifikansi normalitas skor BMI $p<0.05$ yang berarti tidak berdistribusi normal. Pada nilai signifikansi kadar HBD-3 kelompok bebas karies dan berkaries diperoleh nilai $p>0.05$ yang berarti berdistribusi normal (tabel 5.8).

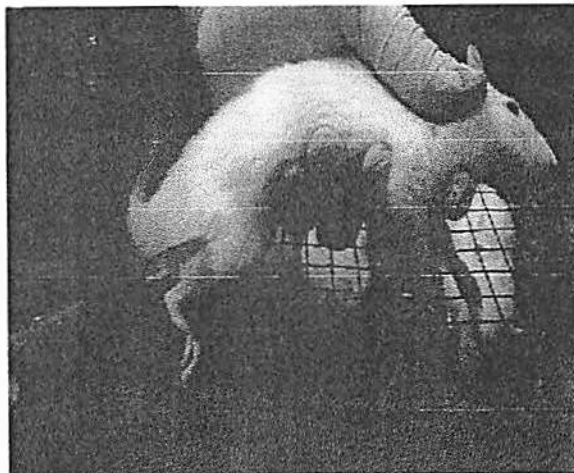
Tabel 5.8. Hasil uji normalitas skor BMI dan kadar HBD-3 kelompok bebas karies dan berkaries.

| Kelompok sampel | Skor BMI Sig. (p) | Kadar HBD-3 Sig. (p) |
|--------------------|----------------------|----------------------------|
| Bebas karies | 0.008 | 0.20 |
| Berkaries | 0.015 | 0.20 |

5.3 Hasil Tahun ke 2



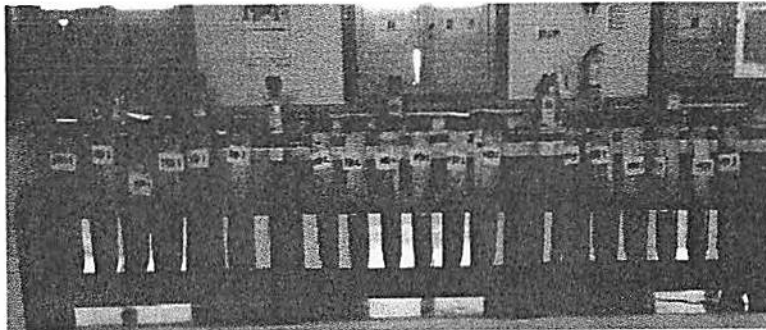
Gambar 1 : hasil imunobloting



Gambar 2 : pembuatan poliklonal HBD1,2,3 pada hewan coba tikus wistar



Gambar 3 : panen antibodi poliklonal, darah diambil dari ekor tikus



Gambar 4 : sebagian dari poliklonal antibodi dari HDD1,2,3



Gambar 5 : rencana pembuatan prototip depstik

BAB 6
RENCANA TAHUN BERIKUTNYA

Hasil poliklonal antibody digunakan sebagai standard pembuatan dipstick diagnostic karies gigi dan akan diajukan pada Penelitian Insinas



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Penelitian keseluruhan telah dianalisis melihat hubungan antar variabel (BMI, SES, pH saliva, flow saliva, jumlah DMF-t sebelum dan setelah ditumpat, pada kelompok bebas karies dan karies, menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi HBD-1,2,3 saliva pada kelompok karies dari pada kelompok bebas karies. Sehingga dapat disimpulkan bahwa HBD-1,2,3 saliva bisa digunakan sebagai kandidat biomarker deteksi dini karies gigi

6.2. Saran

Diperlukan penelitian lanjutan Pembuatan rancangan Dipstick dari HBD-1,2 dan 3 untuk memperkuat dalam proses prognosa serta pencegahan karies gigi melalui marker deteksi dini HBD 1,2,3 saliva



DAFTAR PUSTAKA


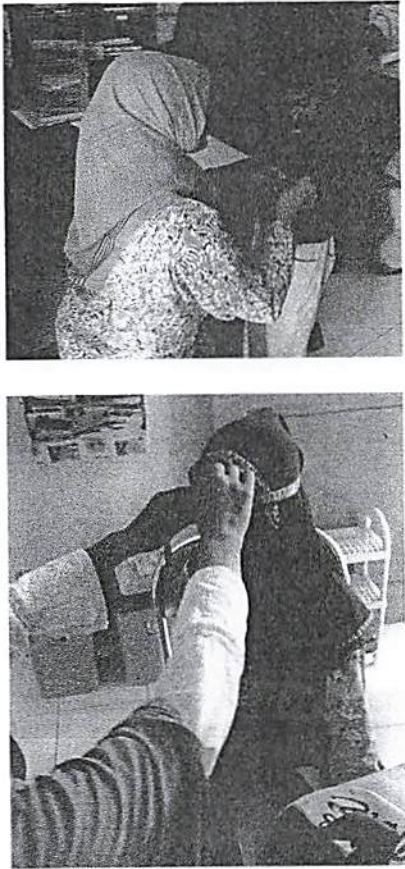
- Allaker RP, 2008. Host defense peptides-a bridge between the innate and adaptive immune responses. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102:3-4
- American Academy of Pediatric Dentistry, Organizing Council. 2003. Definition of Early Childhood Caries (ECC) : *Pediatr Dent* . 25:9.
- Andrews AT. *Electrophoresis Theory, Techniques, Biochemical and Clinical Application*. Clarendon press : Oxford ; 12006
- Chilhood Caries (ECC) : *Pediatr Dent* . 25:9. Balakrishnan M, Simmonds R, John R, 2000. Dental caries is a preventable infectious disease. *J Australian Dent* 4 : 235 – 45.
- Banas JA, Vieckerman MM, 2003. Glucan Binding Proteins of the Oral Streptococci. *JRev Oral Biol Med* 2 : 89 – 99.
- Allaker RP, 2008. Host defense peptides-a bridge between the innate and adaptive immune responses. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102:3-4
- American Academy of Pediatric Dentistry, Organizing Council. 2003. Definition of Early Childhood Caries (ECC) : *Pediatr Dent* . 25:9.
- Balakrishnan M, Simmonds R, John R, 2000. Dental caries is a preventable infectius disease. *J Australian Dent* 4 : 235 – 45.
- Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbial.* 3, 238-250 (2005).
- Bulet P, Stocklin R, Menin L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198:169-184
- Bowen WH, 2002. Do We need to be Concerned About Dental Caries in the Coming Millennium? *Crit Rev Oral Biol Med* 13 : 126- 131.
- Bals, R. 2000. Epithelial Antimicrobial Peptides in Host Defense Against Infection. *Resp. Res.* 1: 141- 50
- Diamond, G, Beckloff, N., Weinberg, A. & Kisich, K. O. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr. Pharm. Des.* 15, 2377-2392 (2009).
- Dale BA, Fredericks LP (2005). Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *CurrIss. Mol Biol*, 7:119- 33.
- Featherstone J, 2000. The Science and Practice of Caries Prevention. *JADA* 7: 888-897.
- Ganz T. et al, 2005. Defensins. Natural Peptide Antibiotics of Human Neutrophils. *J. Clin. Inverst.* 76: 1427- 35.
- Hicks J, Godoy FG, Flaitz C, 2003. Biological Factors in dental caries : role of saliva and dental plaque in dynamic process of demineralization and remineralization, *J Pediatric den* 1 : 47-56.


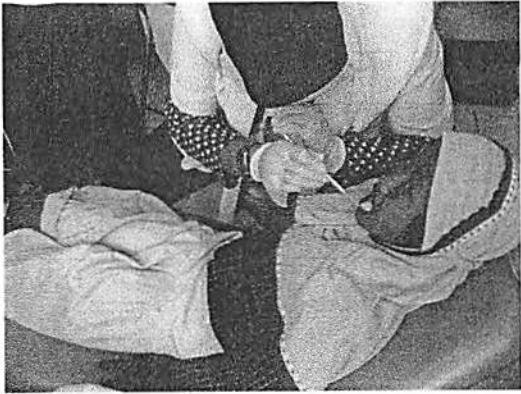
- Henzler Wildman, K. A., Lee, D. K. & Ramamoorthy, A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* 42, 6545-6558 (2003).
- Jeneway CA, Medzhitov R (2002). Innate Immune Recognition. *Annu Rev. Immunol.* 20 : 197- 216
- Jie Tang, Yizhen Yu, Ying MA., 2010. The Epidemic Tendency of Dental Caries Prevalence of School Student From 1991 to 2005 in China. *J Huangzhong Univ Sci Technol.* 30(1): 132- 137.
- Joly S, Maze C, McCray PB Jr, Guthmiller JM. 2004. Human beta defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol.* 42(3):1024-1029.
- Klotman ME, Chang TL 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 6:447-456.
- Lumikari ML and Lommaranta V, 2000. Saliva and dental caries. *J Dent Res* 14 : 40-7.
- Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N et al. 2007. Antimicrobial peptides human beta defensins stimulate epidermal keratinocyte migration proliferation production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 127:594-604
- Nauseef, W M, 2007. How human neutrophils kill and degrade microbes: a integrated view. *Immunol Rev*, 219: 88-102.
- Power JP, Hancock RE. 2003. The Relationship Between Peptide Structure and Antibacterial Activity Peptides. 24: 1681-91.
- Radek K, Gallo R (2007) Pazgier, M., Hoover, D. M., Yang, D., Lu, W. & Lubkowski, J. Human beta-defensins. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 1294-1313 (2006).
- Smith DJ, Shoushtari B, Heschel RL, King WF, Taubman MA. 1997. Immunogenicity and Protective immunity induced by synthetic peptides associated with a catalytic Subdomain of mutans group streptococcal glucosyltransferase. *Infect Immun* ;65: 424-3
- Sophie Joly¹, Connie Maze¹, Paul B. McCray Jr.² and Janet M. Guthmiller^{1,3}, 2008 .Human β -Defensins 2 and 3 Demonstrate Strain-Selective Activity against Oral Microorganisms *JDR* 87:10 915-927
- Segal. A.W. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 197-223 (2005).
- Schneider, J. J., Unholzer, A., Schaller, M., Schafer-Korting, M. & Korting, H. C. Human defensins. *J. Mol. Med.* 83, 587- 595(2005).
- Schutte BC et al, 2002. Discovery of Five Conserved β Defensin Gen Clusters Using a Computational Search Strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:2129- 33.
- Sherwood, Lauralee. 2001. *Fisiologi Manusia: dari Sel ke Sistem.* Jakarta: EGC.
- Sorensen OE, Borregaard N, Cole AM, 2008. Antimicrobial Peptide in Innate Immune Responses. *Contrib. Microbiol.* 15: 61- 77.

- Suttman H, Retz M, Paulsen F, et al. 2008. Antimicrobial Peptide of The Cheprocin Family Show Potent Antitumor Activity Against Bladder Cancer Cells. *BMC. Urol.* 8: 5- 9.
- Tenovuo J, Jentsch H, Soukka T, Karhuvaara L(1992). Antimicrobial factors of saliva in relation to dental caries and salivary levels of mutans streptococci. *J Biol Buccale*, 20(2):85-90.
- Tollin M, et al.2003. Antimicrobial Peptide in The First Line Defence Colon Mucosa Peptides. 24: 523- 30.
- Yeaman, M.R. & Yount, N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55, 27-55 (2003).
- Yang, D., A. Biragyn, D. M. Hoover, J. Lubkowski, and J. J. Oppenheim. 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophilderivedneurotoxin in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 22:181–215.
- Zhu S, 2008. Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CSalphabeta defensins. *Mol Immunol* 45:828–838

LAMPIRAN

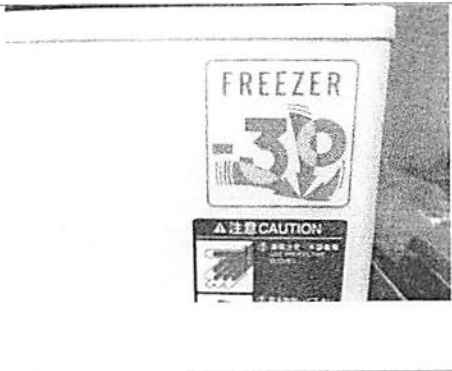

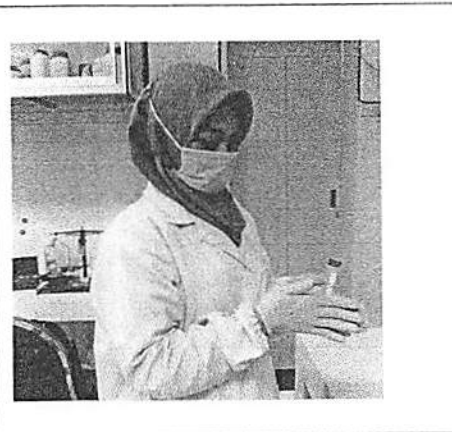
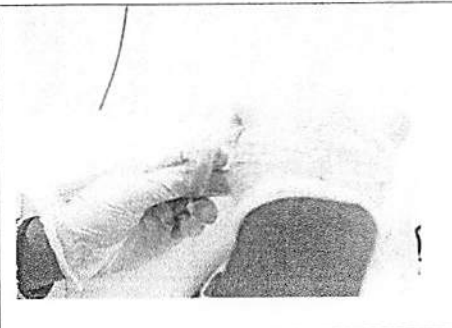
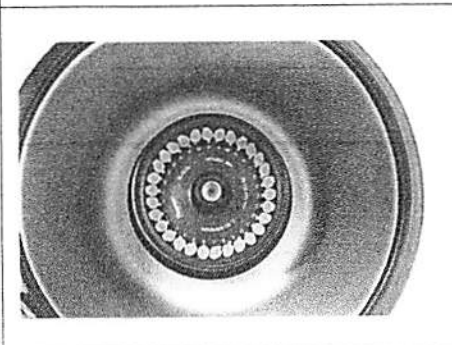
Pengambilan sampel saliva dan pengukuran BMI di SD Qommarudin Gresik



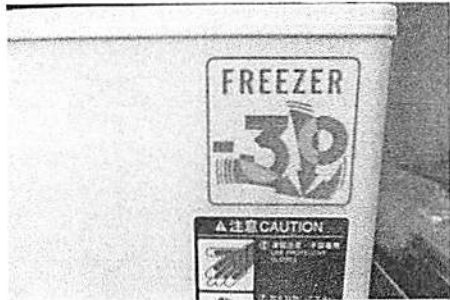
| No. | Deskripsi Kegiatan | Foto Kegiatan |
|-----|---|---|
| 1. | Pengambilan sampel saliva dari anak yang telah di <i>screening</i> kondisi tubuh secara umum dan kondisi rongga mulut |  |
| 2. | Pengisian kuisioner dan pengukuran berat badan, tinggi badan, lingkar kepala dan lingkar pinggang |  |

| | | |
|----|---|--|
| | |  |
| 3. | <p>Perwatan pasien dengan kriteria inklusi penumpatan untuk kemudian diambil ulang salivanya setelah satu minggu penumpatan</p> |  |

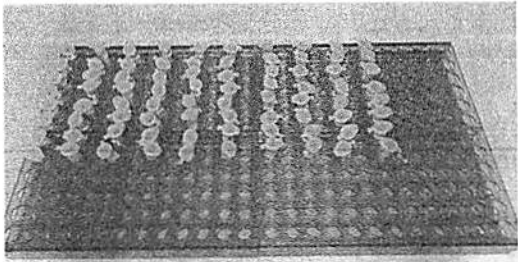
Persiapan sampel saliva





| No. | Deskripsi Kegiatan | Foto Kegiatan |
|-----|--|---------------|
| 1. | <p>Sampel saliva yang telah terkumpul disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -30 °C hingga waktu pengujian sampel</p> | |

| | | |
|----|---|--|
| | |  |
| 2. | Sampel saliva yang akan digunakan, dipindahkan dari lemari pendingin dengan suhu -30°C ke lemari pendingin dengan suhu 4°C kurang lebih selama 20 menit |  |
| 3. | Sampel saliva selanjutnya ditawing dengan menggunakan kedua telapak tangan hingga konsistensi kembali menjadi cair |  |
| 4. | Sampel dipindahkan ke dalam tabung eppendorf (1,5 ml) |  |
| 5. | Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 2400g selama 10 menit dalam suhu -4°C |  |

| | | |
|----|---|---|
| | |  |
| 6. | Supernatan yang terbentuk kemudian dipindahkan ke dalam tabung eppendorf baru dengan menggunakan mikropipet |  |
| 7. | Sampel disimpan kembali dalam lemari pendingin dengan suhu -30 °C hingga akan dilakukan pengujian ELISA |  |

Prosedur ELISA

| No. | Deskripsi Kegiatan | Foto Kegiatan |
|-----|---|--|
| 1. | Sampel saliva yang akan digunakan dikeluarkan dari lemari pendingin kurang lebih 30 menit hingga mencapai suhu ruang |  |
| 2. | ELISA kit yang akan digunakan dikeluarkan dari lemari pendingin kurang lebih 30 menit hingga seluruh reagen bersuhu ruang | |

| | | |
|-----------|--|--|
| | |  |
| <p>3.</p> | <p>Dilakukan <i>fortex</i> pada sampel agar sampel homogen</p> |  |
| <p>4.</p> | <p>Supernatan sampel saliva sebanyak 40µl dimasukan dalam <i>well</i>, ditambah 10µl <i>anti-DEFB3/HBD3 antibody</i>, kemudian ditambah 50µl <i>streptavidin-HRP</i></p> |  |
| <p>5.</p> | <p>Supernatan sampel dan reagen dalam plate dicampur menggunakan <i>micromixer</i></p> |  |



IMEDITEC 2017

Increased levels of human β defensins in children with dental caries

Retno Indrawati Roestamadjji^a, Dian Agustin Wahjuningrum^b, Mohammad Lutfi^c, Tantiana^a, Agung Soesiawan^c and Prof. Seno Pradopo^d



INTRODUCTION

The prevalence of dental caries in the world according to data World Health Organization (WHO) , there are 60-90% of elementary school- children and nearly 100% of adults have cavities. Dental caries is an infection with multifactorial causes that one of them may be affected by host factors such as salivary antimicrobial peptides.



Human Beta Defensin (HBD) are natural antimicrobial that are found in saliva, is contribute to maintaining a balance between health and disease and as part of the host's innate immune response.

MATERIALS AND METHOD

We conducted research on elementary school children aged between 6 and 10 years who are in Pondok Pesantren Qomaruddin Gresik, who must meet the criteria of inclusion and exclusion with simple random sampling technique. Fifty five children participated in the study. student identity, physical criteria, BMI index, OHI index, DMF index, saliva pH, saliva flow rate, oral condition and family economic status. The data obtained are used for the next research correlation. Informed consent subjects obtained through a protocol approved by the medical research ethics committee of the Dental faculty of Airlangga University.

Unstimulated saliva was collected 5 ml with saliva collection tube (Salimetrics, USA), then added Non1-P-40 (Sigma, St. Louis, MO) detergent 0.1%, and stored in 80°C for further analysis. For the analysis of level HBD1, hBD2 and hBD3, saliva diluted and then centrifuged twice at 15,000 rpm for 10 min. Saliva samples were tested by ELISA (Salimetrics, USA) tests as per manufacturer's instructions (Winter et al., 2012) Saliva sampling was performed in the morning (9-10 am). pH saliva were analyzed using a digital pH meter (Shenzhen Youfu Cima). (Janet et al., 2005)

RESULTS

- The results of hBD-1,2 and 3 caries and caries-free clusters were tested for One Sample Kolmogorov-Smirnov Normality Test, to see if the data obtained were normally distributed. In each sample group (Dental Caries n = 33 and Caries Free n = 22), the significance value $p > 0.05$ then all groups of research data is normally distributed.
- The median hBD1, hBD2 and hBD3 saliva levels for the caries-free group (n = 22) were 0.86 $\mu\text{g/l}$, 1.76 $\mu\text{g/l}$ and 1.88 $\mu\text{g/l}$ and for the caries group (n = 33) were 5.26 $\mu\text{g/l}$, 4.25 $\mu\text{g/l}$ and 4.65 $\mu\text{g/l}$. Meaning that the Levels of hBD1, hBD2 and hBD3 did correlate with caries experience were significantly ($p < 0.01$). The saliva pH in the caries group patient was more acidic (6.0 - 6.5) than the caries-free group pH (6.9 - 7.0).

DISCUSSION

Human Beta Defensin-1 (hBD-1) secreted in saliva to inhibit normal flora such as Streptococcus mutans from becoming opportunistic pathogens, so in this study hBD-1 increased highest in the caries group (0.86 $\mu\text{g/ml}$, to 5.26 $\mu\text{g/ml}$), because it is responsible for microorganism that cause dental caries not become pathogen / virulent (Hahn et al., 2000).

hBD-2 and hBD-3 are peptides that appear when induced by microorganisms or components of proinflammatory cytokines TNF- α , IFN- γ , and IL-1 β . This causes the levels of hBD-2 and hBD-3 to increase in the caries group compared with the caries-free group (Hahn et al., 2007; Joly et al., 2004).

CONCLUSION

the high saliva levels secretion hBD-1,2 and 3, can represent the immune response to dental caries. It also can be used as a new way to prevent dental caries and caries risk assessment.

REFERENCES

- Beverly A. Cole, Renuwan Tac, Janet R. Kritski, and Richard J. Jurevic, 2006. Oral Antimicrobial Peptides and Biological Control of Caries. BMC Oral Health 6 (Suppl 1)
- Gravel, Karly S., Doreen M. Levy, Neil K. 2016. Children at Risk: Dental Caries in high-risk, School-Aged African-American Children in Baltimore: A Six-Year Prospective Cohort Study. Pediatr. Dent. 36(3):224-230
- Goel, Sanjib K., Thomas A. Caries, et al. 2007. Quantification of human β -defensin-2 and -3 in Body Fluids. Association for Studies of Invasive University. Dental University, 13:46-152-164.

pH of saliva in patients with dental caries was more acidic than pH of saliva of the control group. This can be explained in accordance with the study conducted by Takahashi et al (1999), that the microorganism which are responsible for caries have a favourable environment for growth in an acidic pH such as Streptococcus mutans grows at a pH of 5.5-7.0 (Joly et al., 2004; Anderson, et al., 2001).



Certificate of Participation

This is to certify that

RETNO INDRAWATI ROESTAMADJI

has presented a paper entitled

INCREASED LEVELS OF HUMAN B DEFENSINS IN CHILDS WITH DENTAL CARIES

at the International Medical Device and Technology Conference
(iMEDiTEC) 2017

held between 6th – 7th September 2017

at Universiti Teknologi Malaysia, Johor Bharu, Malaysia

Prof. Ir. Dato' Dr. Mohammed Rafiq Dato' Abdul Kadir
Conference Chair

I MEDITEC 2017

ORIGINAL PAPER

Increased levels of human β defensins in children with dental caries

Retno Indrawati¹, Rosetamadjir², Dian Agustini Wahjuningrum³, Mohammad Fufi⁴, Jantiana⁴, Agung Soesastawan⁴ and Prof. Seno Pradopo¹¹Department of Oral Biology Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya²Department of Endodontics Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya³Department of Public Health Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya⁴Department of Paediatric Dentistry Faculty of Dental Medicine Universitas Airlangga, Surabaya

* Corresponding: retnoindrawati@fkg.unair.ac.id

ABSTRACT

Background. Human Beta Defensin peptide in saliva contributes as innate immunity to dental caries; the purpose of this study is to determine whether peptide secretion of hBD1,2 and 3 saliva showed as biological response to dental caries. **Methods.** Unstimulated whole saliva was collected for 55 elementary school students (6-10 years old) at Pondok Pesantren Qomaruddin Gresik, for levels of hBD1,2 and 3 were assessed by ELISA. Salivary pH was measured using digital pH meter. **Results.** The median hBD1, hBD2 and hBD3 saliva levels for the caries-free group (n = 22) were 0.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.76 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 1.88 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and for the caries group (n = 33) were 5.26 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 4.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Meaning that the levels of hBD1, hBD2 and hBD3 did correlate with caries experience were significantly (p < 0.01). The saliva pH in the caries group patient was more acidic (6.0 - 6.5) than the caries-free group pH (6.9 - 7.0). **Conclusion.** From the results of this study it can be concluded that the high saliva levels secretion hBD1,2 and 3, can represent the immune response to dental caries. It also can be used as a new way to prevent dental caries and caries risk assessment.

Keywords. Streptococcus mutans, mouthwashes, LPS

INTRODUCTION

The prevalence of dental caries in the world according to data World Health Organization (WHO), there are 60-90% of elementary school children and nearly 100% of adults have cavities (WHO, 2012). According to the US National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) in 1999-2004 children aged 6-8 years had a prevalence of dental caries and permanent tooth 56.12% and the prevalence of untreated and permanent untreated permanent tooth by 37.38% (WHO, 2012; Ghazal et al., 2016).

External and internal factors affect each other's condition in the oral cavity. Diet or nutrition as well as mechanical activity (toothbrushing) are examples of external factors, while saliva (including pH and saliva flow rate), DMF levels, number of Streptococcus mutans, and oral immune systems are some examples of internal factors in maintaining oral conditions, because a balanced oral cavity condition will maintain normal flora in the oral cavity, whereas if conditions change, normal flora may turn into opportunistic pathogens, one of which is characterized by dental caries (Beverly et al., 2005).

Dental caries is an infection with multifactorial causes that one of them may be affected by host factors such as salivary antimicrobial peptides. AMP is a natural antimicrobial which is the first line of defense against a wide spectrum of pathogens. Human beta defensin as part of the AMP may be very important in the oral cavity, where members of the microbial flora present at all times in high quantities (Beverly et al., 2006).

Human Beta Defensin (HBD) are natural antimicrobial that are found in saliva, its contribute to maintaining a balance between health and disease and as part of the host's innate immune response. The secretion of hBD2 saliva is induced by commensal bacterial community of the oral cavity, this suggesting that the commensal bacterial community acts in a favorable way in preparing the innate immune response in the oral cavity, and This may have major significance for understanding the complex defenses in the oral environment (Winterer et al., 2012; Gosh et al., 2007).

Human Beta Defensin-1 (hBD-1) is constitutive, and serves to preventing commensal bacteria from becoming opportunistic, whereas expression of hBD-2,3 was induced by proinflammatory mediators such as IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , lipopolysaccharide (LPS) and are more effective against almost all pathogens. These peptide has a special function in maintaining the level of commensal bacteria (Beverly et al., 2005). Human beta defensin also acts as chemoattractants for T cells, immature dendritic cells, B cells, neutrophils and macrophages in enhancing adaptive immunity so that the expression of saliva human beta defensin could have a role in protecting the tooth structure from caries as well as protecting oral mucosa (Beverly et al., 2006; Gosh et al., 2007).

MATERIALS AND METHOD

We conducted research on elementary school children aged between 6 and 10 years who are in Pondok Pesantren Qomaruddin Gresik, who must meet the criteria of inclusion and exclusion with simple random sampling technique. Fifty five children participated in the study. Health history surveys are completed by the parent / guardian of the subject. Questionnaires include student identity, physical criteria, BMI index, OHI index, DMF index, saliva pH, saliva flow rate, oral condition and family economic status. The data obtained are used for the next research correlation. Informed consent subjects obtained through a protocol approved by the medical research ethics committee of the Dental faculty of Airlangga University.

Unstimulated saliva was collected 5 ml with saliva collection tube (Salimetrics, USA), then added NonI-P-40 (Sigma, St. Louis, MO) detergent 0.1%, and stored in -80 $^{\circ}\text{C}$ for further analysis. For the analysis of level hBD1, hBD2 and hBD3, saliva diluted and then centrifuged twice at 15,000 rpm for 10 min. Saliva samples were tested by ELISA (Salimetrics, USA) tests as per manufacturer's instructions (Winterer et al., 2012). Saliva sampling was performed in the morning (9-10 am). pH saliva were analyzed using a digital pH meter (Shenzhen Youfu Cina) (Janet et al., 2005).

RESULTS

The results of hBD-1, 2 and 3 caries and caries-free clusters were tested for One Sample Kolmogorov-Smirnov Normality Test to see if the data obtained were normally distributed. In each sample group (Dental Caries n = 33 and Caries Free n = 22) the significance value $p > 0.05$ then all groups of research data is normally distributed.

The median hBD1, hBD2 and hBD3 saliva levels for the caries-free group (n = 22) were 0.86 $\mu\text{g/ml}$, 1.76 $\mu\text{g/ml}$ and 1.88 $\mu\text{g/ml}$ and for the caries group (n = 33) were 5.26 $\mu\text{g/ml}$, 4.25 $\mu\text{g/ml}$ and 4.85 $\mu\text{g/ml}$. Meaning that the levels of hBD1, hBD2 and hBD3 did correlate with caries experience were significantly ($p < 0.01$). The saliva pH in the caries group patient was more acidic (6.0 - 6.5) than the caries-free group pH (6.9 - 7.0).

DISCUSSION

Research on the relationship of dental caries with hBD-1 and hBD-2 has been done, but in combination with hBD-2 and hBD-3 is still not done, this study sample is taken from elementary school students in (Qomaruddin Gresik boarding school with minimal dental care facility (Gosh *et al.* 2007).

Streptococcus mutans is bacteria cause dental caries that can stimulate the cytokine. the release of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, IL-10), will stimulate the secretion of hBD-2 and hBD-3 saliva. Furthermore, the peptide hBD-2 and hBD-3 will perform antimicrobial action in the fight against oral bacteria. Sophie Joly *et al.* (2004) research used Radial diffusion to test activities hBD-2 and hBD-3 against oral bacteria. The result hBD-3 demonstrated greater antimicrobial activity and was effective. According to the results of this study, the mean saliva levels of hBD3 were 1.88 $\mu\text{g/ml}$ for the caries-free group and 4.85 $\mu\text{g/ml}$ for all caries-proof subjects, the highest compared with hBD-2 (Seethalakshmi *et al.*, 2016; Anton *et al.*, 2002; Sophie *et al.*, 2004).

Human Beta Defensin-1 (hBD-1) secreted in saliva to inhibit normal flora such as Streptococcus mutans from becoming opportunistic pathogens, so in this study hBD-1 increased highest in the caries group (0.86 $\mu\text{g/ml}$, to 5.26 $\mu\text{g/ml}$), because it is responsible for microorganism that cause dental caries not become pathogen virulent (Hahn *et al.*, 2000).

When bacteria colonize within the oral cavity and cause inflammatory processes, the lesions induce innate and adaptive immune responses. Cells in periapical lesions are macrophages, neutrophils, T and B lymphocytes, osteoclasts, osteoblasts, and fibroblasts, in which they express a large number of proinflammatory cytokines, including IL-6, IL-4, IL-1 β , IL-1 α , TNF- α , IL-12, IL-8, IL-10. The components of the cytokine TNF- α , IL-8, and IL-6 in saliva are elevated in dental caries state compared with caries-free. hBD-2 and hBD-3 are peptides that appear when induced by microorganisms or components of proinflammatory cytokines TNF- α , IL-8, and IL-1 β . This causes the levels of hBD-2 and hBD-3 to increase in the caries group compared with the caries-free group (Hahn *et al.*, 2000; Joly *et al.*, 2004).

Human β -defensins 1, 2 and 3 (hBD-1, hBD-2 and hBD-3) are inducible peptides present at sites of infection in the oral cavity. A few studies have reported broad-spectrum antimicrobial activity for that three peptides. Sophie Joly *et al.* (2004) research used Radial diffusion to test activities hBD-2 and hBD-3 against *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Peptostreptococcus micros*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, and *Candida albicans*. The result hBD-3 demonstrated greater antimicrobial activity and was effective. According to the results of this study, the mean saliva levels of hBD3 were 1.88 $\mu\text{g/ml}$ for the caries-free group and 4.85 $\mu\text{g/ml}$ for all caries-proof subjects, the highest compared with hBD-2 (Janet *et al.*, 2005; Seethalakshmi *et al.*, 2016; Anton *et al.*, 2002).

pH of saliva in patients with dental caries was more acidic than pH of saliva of the control group. This can be explained in accordance with the study conducted by Lokabaster *et al.* (1999) that the microorganism which are responsible for caries, have a favourable

environment for growth in an acidic pH such as *Streptococcus mutans* grows at a pH of 5.5-7.0 (Joly *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2001).

From these results it is furthermore necessary to know the antimicrobial proteins of the beta-defensin human peptide. This opens new perspectives for design natural antimicrobials and opens up new perspectives for the application of peptides against multiresistant microorganisms.

CONCLUSION

The results of this study it can be concluded that the high saliva level secretion hBD1, 2 and 3, can represent the immune response to dental caries. It also can be used as a new way to prevent dental caries in caries risk assessment.

REFERENCES

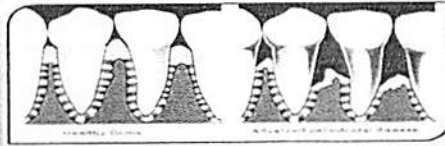
- Anderson P, MP Hector. 2001. Critical pH in resting and stimulated whole saliva in groups of children and adults. *International Journal of Paediatric Dentistry*. Wiley Online Library. Anton Dunsche Yahya Aqil, Henrik Dommsch, Reiner Siebert, Jens-M. chröder and Søren Jepsen. 2002. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *European Journal of Oral Science* (110) 2, p 121-124. Beverly A Dale and L. Page Fredericks. 2000. Antimicrobial Peptides in the Oral Environment: Expression and Function in Health and Disease. *Curr Issues Mol Biol* Jul; 7(2): 119-133.
- Beverly A Dale, Renchuan Tao, Janet R Kimball, and Richard Jurevic. 2006. Oral Antimicrobial Peptides and Biological Control of Caries. *BMC Oral Health* 6 (Suppl 1).
- Ghazal, Tariq S., Steven M. Levy, Noel K. 2016. Childers *et al.* Dental Caries in High-Risk School-Aged African-American Children in Alabama: A Six-Year Prospective Cohort Study. *Pediatr Dent*, 38(3):224-230.
- Gosh, Santosh K., Thomas A. Gerken, *et al.* 2007. Quantification of Human β -defensin-2 and -3 in Body Fluids: Application for Studies of Innate Immunity. *Clinical Chemistry*, 53(4): 757-764.
- Hahn C.I., Best AM, Tew JG. Cytokine Induction by Streptococcus mutans and Pulpal Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 2000 (68) (2): 6785-87.
- Hahn C.I. and Liewehr IR. Relationships between Caries Bacteria Host Responses, and Clinical Signs and Symptoms of Pulpitis. *Endod* 2007; 33: 213-215.
- Janet R. Kimball, Norma Wells, Jeffery Berndt, and Beverly A. Dale. 2005. Salivary Antimicrobial Peptide Expression and Dental Carie Experience in Children. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(9): 3883-3888.
- Winter, Jochen and Matthias Wenghoefer. 2012. Human Defensins: Potential Tools for Clinical Application. *Polymers*, 4: 691-709.
- Joly S, Maze C, McCray PB Jr, and Guthmiller JM. Human beta defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (3): 1024-1029.
- Seethalakshmi C, R C Jagat Reddy, Nisha Asifa, and S Prabhlu. 2016. Correlation of Salivary pH, Incidence of Dental Caries and Periodontal Status in Diabetes Mellitus Patients: A Cross-sectional Study. *J Clin Diagn Res*. 10(3): 12-14.
- Sophie Joly, Connie Maze, Paul B. McCray, Jr, and Janet M. Guthmiller. 2004. Human β -Defensins 2 and 3 Demonstrate Strain Selective Activity against Oral Microorganisms. *J Clin Microbiol Mar*; 42(3): 1024-1029.
- WHO (World Health Organization). Oral Health [serial online]. 2017; [cited 2017 Feb 27]. Available from: URI: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en>



APSP-CR-30

Evaluating Human beta defensin-2 in patients with chronic periodontal whether treatment affected this process

Retno Indrawati, Erni Maduratna, Johan, Seno Pradopo



INTRODUCTION

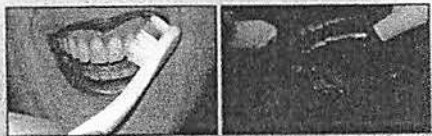
Human β -defensins (HBDs) play an important role in the oral cavity as a first-line defence against gram-negative and gram-positive bacteria. The modulation of the β -defensins expression in the oral cavity can be orchestrated by receptors present in the cell membrane that recognize certain molecular patterns associated to periodontal pathogens, including *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Fusobacterium nucleatum*. Gingipains, trypsin-like proteases produced by *P. gingivalis*, up-regulate HBD-2 mRNA expression through protease-activated receptor-2 (PAR2) in gingival epithelial cells.

METHODS

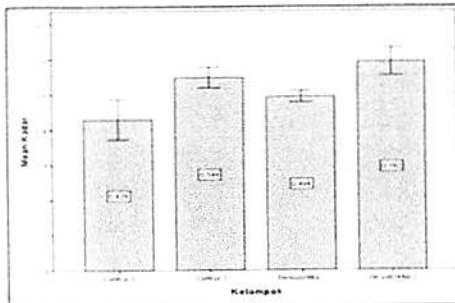
Salivary fluid samples were collected from periodontally healthy (Control) and chronic periodontitis patients. The data were collected twice, at the first visit and four weeks later. The data obtained are divided into four groups. The treatment carried out in the control group was toothbrush instruction,



where as in the periodontitis group were the toothbrush instructions coupled with scaling and root planing. Salivary HBD-2 levels were analysed by ELISA. Data analysis result of HBD-2 score was obtained by using statistic test with 95% significance level ($p < 0,05$) and processed with SPSS programe version 18



RESULT



There was a difference in scores of HBD-2 levels for both groups in the Control and Periodontitis group. In the T-test. $p = 0.14$ which means there was a statistically significant difference ($p < 0.05$) in both groups. Before and after therapy of Periodontitis in the Periodontitis group was 0.09871 ± 0.04422 . Paired T-Test was tested with $p = 0.001$ which means that there was statistically significant difference ($p < 0.005$) for HBD-2 levels in periodontitis patients before and after therapy.

HBD-2 levels were higher in periodontitis group than in controls group

DISCUSSION

HBD-2 expression in normal oral epithelium is due to the constant stimulation of the innate immune response by commensal, non-pathogenic bacteria. In periodontitis patients, the presence of pathogenic bacteria will upregulation of HBD-2 expression at the gingival margin, in the inflamed epithelium (Dale BA et al 2001)


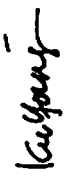

In a recent study Increasesese *P.Gingivalis* and $TNF-\alpha$ were associated with increase production of HBD-2 in chronic periodontitis. Periodontal treatment significantly reduced HBD-2 levels in chronic periodontitis patients associated with a decrease in *P. gingivalis*

ASIAN PACIFIC SOCIETY OF PERIODONTOLOGY

CERTIFICATE of Attendance

presented to
Retno Indrawati

For Participation in the 12th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting
September 22 to 24, 2017
The-K Hotel, Seoul, Republic of Korea

| | | | | | |
|---|----------------|---|----------|---|---------------|
|  | Yulianti Kemal |  | Young Ku |  | Seong-Ho Choi |
|---|----------------|---|----------|---|---------------|



THE RELATION BETWEEN BODY MASS INDEX, SALIVARY HBD-3 SECRETION IN CHILDREN WITH CARIES AND CARIES-FREE

Retno Indrawati, Muhammad Luthfi, Hendri Setiyobudi, Maretaningtias
Dwiariani, Dien Nisa Aulia, Tamima Izzat, Seno Pradopo



BACKGROUND

Body Mass Index may also serve as an indicator to predict the occurrence of a disease, including dental caries. The WHO data shows 60-90% children suffered perforated teeth. Dental caries is the damage the surface of the teeth due to imbalance in the process of demineralization and remineralization with multifactorial etiology such as the presence of the substrate, agents, and host response. One form of response to the first host in the oral cavity is the presence of antimicrobial peptides or antimicrobial peptides (AMP) which is contained in saliva and provide broad-spectrum defense against pathogens.

HBD-3 is the biomarkers response to lipopolysaccharide (LPS) bacteria, Peptidoglycan and leptoichoic acid bacteria, proinflamasi mediator, as well as interferon. Previous research showed that BMI is closely related to the number of cells are leukocytes, monocytes, neutrophils and total modulate immune system parameters. Adipose tissue in individuals with high BMI scores were producing many proinflamasi cytokines including TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8, which then affect the workings of the immune system and stimulates the cells of the innate immune including HBD-3

METHODS

This research is observational cross sectional study. 62 student are prompted to fill in a questionnaire for sampling, the measurements of height, weight and condition of oral cavity screening



Saliva samples from children aged 9 to 10 years as much as 62 in boarding schools Qommarudin, Gresik. Children are instructed not to eat an hour before sampling. The collecting whole saliva (5 ml) done with the technique of passive droll at 8-10 in the morning.



HBD-3 levels in the sample is measured by ELISA using Bioassay Technology Laboratory Human beta-defensins 3 ELISA kit. HBD-3 levels of testing done at the Institute of Tropical Diseases University of Airlangga.

RESULTS

Table 1. Average and standard deviation of HBD-3 levels of each group

| Sample Groups | HBD-3 Levels X - SD (ng/ml) |
|---------------|--------------------------------|
| Group 1 | 3.366 - 0.892 |
| Group 2 | 2.941 - 0.772 |
| Group 3 | 3.262 - 0.742 |
| Group 4 | 2.579 - 0.636 |

Table 2. Average and standard deviation of BMI Score and HBD-3 level for Caries and Caries-free groups.

| SAMPLE GROUP | BMI SCORE X - SD (kg/m ²) | HBD-3 Levels |
|--------------|--|--------------|
| Caries-free | 17.46 - 3.60 | 3.153 - 0.3 |
| Caries | 17.05 - 4.24 | 2.920 - 0.7 |

Table 3. Signifikansi dan koefisien korelasi uji Spearman's skor BMI dengan kadar HBD-3 pada kelompok bebas karies dan berkaries.

| | Sig (p) | correlation coefficient (r) |
|-------------|---------|-----------------------------|
| Caries-free | 0.199 | -0.250 |
| Caries | 0.009 | -0.443 |

Caries-free group show the value of significance $p = 0.199$, $p > 0.05$ meaning there is no correlation between the score and BMI levels of HBD-3. The value of significance on the caries group $p = 0.009$ $p < 0.05$ means there are correlation between BMI and score levels HBD-3 correlation coefficient $r = -0.443$ shows connected upside down with the power relationships are.

DISCUSSIONS

Tao et al. (2005) stating that the human beta-defensins primarily HBD-3 lot of contained the oral cavity on the infected spot and effectively to prevent the occurrence of bacter infection of *Streptococcus mutans*. On the results of the research that has been done, shows that there is a difference between the 3 levels of HBD caries-free group BMI ≤ 15 kg/m² with caries free group BMI ≥ 16 kg/m², the average levels of HBD-3 on group BMI ≤ 15 kg/m² higher than the BMI ≥ 16 kg/m². However, there was no significant difference. This indicates that the secretion of HBD-3 still occur in conditions free of caries, is supported by the opinions Dhople (2006) reported that analysis using RT-PCR detect any HBD-3 on the mucosa of the oral cavity and the saliva glands, inflammatory conditions or no inflammatory, the existence this HBD-3 levels is also caused due to the stimulation of local commensal bacteria.

Caries group BMI ≤ 15 kg/m² and a BMI ≥ 16 kg/m², there is the difference in the levels HBD-3, average levels of HBD-3 on group BMI ≤ 15 kg/m² higher than group BMI ≥ 16 kg/m² *Streptococcus mutans* induces cell surface TLR-2 along with TLR-1 or TLR-6 on the epithelium of the oral cavity, due to the presence of Peptidoglycan and leptoichoic acid on the cell walls of bacteria, then mengaktifasi NF- κ B to induce they produced cytokines TNF, proinflammation, IL-1 β , IFN- γ , IL-6, IL-8, which activate Innate immune system and secre HBD-3.

CONCLUSION

the results of the study can be seen that the average levels of HBD-3 saliva on caries-free group higher than caries group

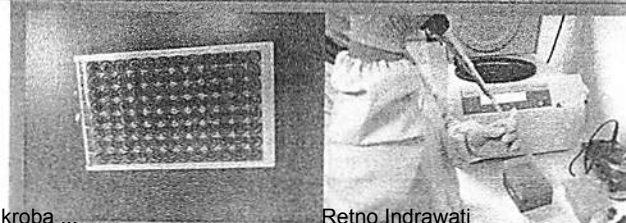
REFERENCES

Khaled A, Mohamed WS, Moustafa A et al. 2016. The Association Between Body Mass Index and Dental Caries: Cross-Sectional Study. *J Clin Med Res*. 8 (2) pp. 147-152.

Tao R, Richard J, Juveric, Kimberly K, Coulton et al. 2005. Salivary Antimicrobial Peptide Expression and Dental caries Experience in Children. *Antimicrob Agents Chemoter*. 49 (9) 3883-88.

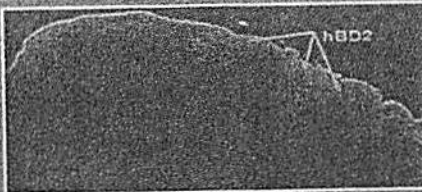
Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy A. 2006. Elsevier *BBA-Biomembranes* 1758 pp. 1499-1512

Ekarat P. 2010. The role of salivary antimicrobial peptides in shaping *Streptococcus mutans* ecology. University of Iowa. Iowa Research online pp:10-18.



HUMAN B-DEFENSIN-1, 2 AND -3 IN SALIVA FOR STUDIES OF INNATE IMMUNITY

0181



RETNO INDRAWATI, MUHAMMAD LUTHFI, INDESWATI DIYATRI, AGUNG SOESIawan, DWI RAHMawATI, SENo PRADOPo

BACKGROUND

Human Beta defensins are cationic, anti-microbial peptides, produced by many cell types and which play prominent roles in the innate immune response of mammals. six beta-defensins (HBD1-6) have demonstrated broad-spectrum in vitro antimicrobial activity against bacteria, fungi and viruses - activities significant for in vivo protection against pathogens.

RESEARCH PURPOSES

This Research measurement of Human Beta Defensins (1,2 and 3) in saliva for fifty elementary school students, aged 10 - 11 years on Islamic boarding school Qomarruddin Gresik, East Java, Indonesia.



METHOD

This observational cross section study was involving in Qomarruddin Boarding School, Gresik. The children are prompted to fill in a questionnaire, then body height and weight measurement, and examination of dental caries was done subsequently. The sample criteria for research are children aged 10 until 11 years, dental caries sample (DMF \geq 3) and free of caries, physically healthy, and are not being in suppressive immune treatment. Collected 3 ml saliva samples, taken from 50 elementary school students in Pondok Pesantren Qomarruddin Bangah Gresik with passive drool method without stimulation, at 09.00 - 10.00, by use of sterile disposable tubes. Saliva centrifuged at 30 000g at -4 °C for 20 min, and stored at -70 °C until use. We quantified HBDS by ELISA kit (Dierst, according to factory procedures)



RESULT

There was no significant HBD-1 concentration in free caries and caries groups (p-Value: <0.05). There was a significant difference between HB02 concentration and HB03 in caries-free and caries groups (p-Value: <0.05). There was a significant negative relationship between BMI and Concentration HB02 in the caries group (p-Value: 0.005, r: -0.414), but not for HB0-1 and HB0-3. Caries-free group show the value of significance p = p 0.199 > 0.05, meaning there is no correlation between the score and BMI levels of HB0-3. The value of significance on the caries group p = 0.009, p<0.05 means there are correlation



DISCUSSION

Antimicrobial peptides constitute one of innate defense system. HBD-1 has a role to prevent local commensal bacteria in the oral cavity becomes pathogenic bacteria, while the HBD-2 and HBD-3 is an antimicrobial induced (levels can rise if there is stimulation of microbial) and acts effectively against pathogenic bacteria.

HBDS play an important role in the oral cavity, they are the first defense against bacterial infection. The host will utilize BD-2,3 against S. mutans as the cause of caries infection. HB0-1 levels in the high DMF-T index obtained salivary HB0-1 concentration of 709.93 \pm 243.30 pg / ml. This is because HB0-1 is not able to inhibit the pathogenicity of bacterial dental caries, then replaced with HB0-2 and 3 which function to strengthen antimicrobial activity in defensins against invading pathogenic bacteria. When there is chronic inflammation such as dental caries, wherein there are inflammatory mediators (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8) which

CONCLUSIONS

the overall demand for the use of natural substances cause the increased interesting in the use of antimicrobial peptides. Consequently, there are possibilities to develop new strategies to treat dental caries. Antibacterial peptides are the alternatives to conventional

REFERENCES

- Jurezak A, Kościelniak D, Papież A, et al. 2015 : A study on β -defensin-2 and histatin-5 as a diagnostic marker of early childhood caries progression. Biological Research 54:61.
- Perizhambary, A., Andrew S. 2012 : Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity FEMS Microbiology s (1):5-10



International Association for Dental Research
Southeast Asian Division



32nd IADR-SEA & 29th SEAAD
VIETNAM 2018

CERTIFICATE OF PRESENTATION

This is to certify that you have poster presentation at
The 32nd IADR-SEA Division Annual Scientific Meeting
Held on September 13th - 14th, 2018, Da Nang, Vietnam

RETNO INDRAWATI ROESTAMADJI

Assoc. Prof. Ngo Thi Quynh Lan
Chairperson of LOC

Prof. Chun-Pin Lin
President of IADR-SEA





Search: brazilian dental journal

Compose

Inbox 982

Starred

Snoozed

Important

Sent

Drafts 48

retno +

Brazilian Dental Journal - ScholarOne Manuscript

Inbox x

Brazilian Dental Journal <onbehalfof+onbehalfof+manuscriptcentral.com@manus to me

09-May-2017

Dear Dr. Indrawati:

This e-mail has been generated by the entry of your email address into the 'Passwrc <https://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo>.

To set your permanent password please click the link below. Clicking the link will ta

https://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo?URL_MASK=c1084b1bff56467bb66

Sincerely,
Brazilian Dental Journal Editorial Office

No recent chats
Start a new one

Reply

Forward

**BRAZILIAN
DENTAL
JOURNAL**

**THE RELATION BETWEEN BODY MASS INDEX WITH
SALIVARY HBD-3 SECRETION IN CHILDREN WITH CARIES
AND CARIES-FREE**

| | |
|------------------|---|
| Journal: | <i>Brazilian Dental Journal</i> |
| Manuscript ID | Draft |
| Manuscript Type: | Original Article |
| Keyword: | Innate immune system, proinflammatory cytokines, saliva defense, adiposa tissue |
| | |

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo>

THE RELATION BETWEEN BODY MASS INDEX WITH SALIVARY HBD-3 SECRETION IN CHILDREN WITH CARIES AND CARIES-FREE

Running Title: Salivary HBD-3

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

<https://mc04.manuscriptcentral.com/dj-scielo>

ABSTRACT

Background: Microbial infections will trigger proinflammatory cytokines and activate the secretion of human beta deficiency (HBD) from the epithelial mucosa of the oral cavity and salivary glands. The immune system is affected by the Body Mass Index (BMI). The BMI represents the condition of the structure of adipose tissue and blood vessels, which affect the number of immune cells and cytokine production.

Purpose: To prove the Relation between body mass index (BMI) with salivary HBD-3 secretion in children with caries and caries free.

Method: 5 ml of saliva from 9-10- year old elementary school students at Qommarudin Gresik. collected without stimulation using passive droll techniques. Dental caries is examined by mouth glass and sonde by the dentist to find out DMF-t samples (according to WHO standards). HBD-3 titers were tested with bioassay ELISA kit laboratory technology.

Result; There was a relationship between BMI and HBD-3 levels in the caries group ($p < 0.05$, $p = 0.009$) with a medium level of association. HBD-3 levels in the caries group showed significant differences ($p < 0.05$, $p = 0.007$), but no significant differences in the caries-free group ($p > 0.05$, $p = 0.189$).

Conclusion: Levels of HBD-3 secretion in caries children are influenced by individual BMI conditions.

Keywords: *Innate immune system, proinflammatory cytokines, saliva defense, adiposa tissue*

<https://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo>

Surabaya, 30 Mei 2018

Nomor : 150/INT-DENTJ/V/2017
Hal : Pemberitahuan penolakan naskah
Lampiran : -

Kepada Yth.

Dr. Retno Indrawati, drg.,M.Si

Departemen Biologi Oral

Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Airlangga

Kami beritahukan bahwa naskah sejawat dengan judul :

**THE RELATION BETWEEN BODY MASS INDEX (BMI) WITH SALIVARY
HBD-3 SECRETION IN CHILDREN WITH CARIES AND CARIES-FREE**

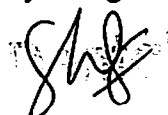
Authors: Retno Indrawati¹, Muhammad Luthfi,² Hendri Setiyobudi³, Alexandro⁴, Dwi Rahmawati⁵,
Dien Nisa Aulia⁶ ⁷Tamima ⁸Seno Pradopo

Setelah kami telaah secara seksama melalui tinjauan penyunting Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi) dan melalui rapat Tim Penyunting Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi), kami mohon maaf tidak dapat mempublikasikan naskah tersebut.

Atas perhatiannya, kami ucapkan terima kasih.

Hormat Kami,

Ketua Penyunting Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)



Majalah Kedokteran Gigi

Saka Winias, drg., M.Kes,Sp.PM

NIP. 199005152014042000

Editorial Address:

Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga
c/o: Jl. Mayjend. Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132, INDONESIA
Telp. +62-31-5039478 Fax. +62-31-5039478

E-mail: dental_journal@fkg.unair.ac.id, Website: <http://ejournal.unair.ac.id/index.php/MKG>

