

LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)



KEMAMPUAN *ELECTROLYZED REDUCED WATER* PADA PROSES
INFLAMASI JARINGAN PERIODONTAL DENGAN PERIODONTITIS

TAHUN KE - 1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. Rini Devijanti Ridwan drg., MKes.

NIDN : 0016126404

Dr. Indeswati Diyatri drg.,MSi

NIDN : 001503620

Dr. R. Darmawan Setijanto drg.,MKes

NIDN : 0005106109

Wisnu Setyari Juliastuti drg.,MKes.

NIDN : 0010075702

DIBIYAYAI OLEH:

DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN 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
NOVEMBER 2018

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



**KEMAMPUAN *ELECTROLYZED REDUCED WATER* PADA PROSES
INFLAMASI JARINGAN PERIODONTAL DENGAN PERIODONTITIS**

TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. Rini Devijanti Ridwan drg., MKes.

NIDN : 0016126404

Dr. Indeswati Diyatri drg.,MSi

NIDN : 001503620

Dr. R. Darmawan Setijanto drg.,MKes

NIDN : 0005106109

Wisnu Setyari Juliastuti drg.,MKes.

NIDN : 0010075702

DIBIYAI OLEH:

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN 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
NOVEMBER 2018**

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : KEMAMPUAN ELECTROLYZED REDUCED WATER PADA PROSES INFLAMASI JARINGAN PERIODONTAL DENGAN PERIODONTITIS

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr RINI DEVIJANTI RIDWAN, M.Kes
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 NIDN : 0016126404
 Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 Program Studi : Ilmu Kedokteran Gigi
 Nomor HP : 081331049714
 Alamat surel (e-mail) : rini-d-r@fkg.unair.ac.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : Dr INDESWATI DIYATRI
 NIDN : 0015036204
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : Dr R DARMAWAN SETIJANTO S.KG, M.Kes
 NIDN : 0005106109
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (3)

Nama Lengkap : WISNU SETYARI JULIASTUTI M.Kes
 NIDN : 0010075702
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
 Alamat : -
 Penanggung Jawab : -
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 87,500,000
 Biaya Keseluruhan : Rp 200,000,000

Mengetahui,
 Dekan Fakultas Kedokteran Gigi UNAIR



(Dr. R Darmawan Setijanto drg., MKes)
 NIP/NIK 196110051988031003

Kota Surabaya, 9 - 11 - 2018
 Ketua,

(Dr RINI DEVIJANTI RIDWAN, M.Kes)
 NIP/NIK 196412161990022001

Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi UNAIR



(Prof. H. Hery Purnobasuki, Drs., M.Si., PhD)
 NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN PENELITIAN

Periodontitis merupakan penyakit multifaktorial, etiologi periodontitis merupakan interaksi antara plak gigi pada subgingiva yang mengandung bakteri patogen penyebab periodontitis dan *host*. Etiologi utama penyakit pada jaringan periodontal adalah bakteri anaerob fakultatif gram negatif yang terdapat di dalam lapisan biofilm subgingiva. Bakteri ini mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan mekanisme pertahanan *host* dalam memperbaiki jaringan yang rusak tetapi dalam waktu yang bersamaan, bakteri ini akan memproduksi toksin yang akan menghancurkan epitel dan struktur jaringan periodontal. Bakteri patogen penyebab periodontitis dipengaruhi oleh kebersihan rongga mulut, adanya plak atau retensi makanan, dan diet. Sedangkan *host* dipengaruhi oleh adanya faktor genetik yang menentukan respons imun spesifik dan non spesifik, kebiasaan, faktor sosial dan fisik. Adapun bakteri utama penyebab periodontitis agresif adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.actinomycetemcomitans*) sedangkan bakteri predominan pada periodontitis kronis adalah *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*)

Elektrolisis merupakan proses pengolahan air yang akan menghasilkan dua bentuk air berupa air bersifat basa (pH tinggi) dan air bersifat asam dan teroksidasi (pH rendah). *Electrolyzed Reduced Water* (ERW) merupakan air yang bersifat alkalis, ERW memiliki pH tinggi dan air yang teroksidasi (ORP) akan memiliki pH rendah. Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan terdahulu ERW mempunyai kemampuan sebagai anti kanker, menghambat angiogenesis pada tumor dan efektif sebagai terapi pada penderita dengan Diabetes Mellitus.

Penggunaan ERW sampai saat ini masih belum banyak dipakai dibidang kedokteran gigi. Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan analisis pengaruh dari penggunaan ERW terhadap kesehatan jaringan periodontal pada kondisi periodontitis. Metoda yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan melakukan analisis pada *biomarker* dari terjadinya kerusakan jaringan periodontal, sehingga pada penelitian ini dilakukan pengamatan pada *marker-marker* untuk reaksi inflamasi dan aktivitasnya terhadap kerusakan tulang alveolar. Dengan dilakukannya penelitian ini akan memberikan kontribusi dari penggunaan ERW dalam penatalaksanaan penderita periodontitis baik agresif maupun kronis.



PRAKATA

Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah akhirnya laporan akhir penelitian yang berjudul Kemampuan *Electrolyzed Reduced Water* pada Proses Inflamasi Jaringan dengan Periodontitis pada pendanaan dari Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi tahun pertama dapat diselesaikan dengan baik. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kemampuan pengaruh dari penggunaan *ERW* terhadap kesehatan jaringan periodontal pada kondisi periodontitis. Metoda yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan melakukan analisis pada *biomarker* dari terjadinya kerusakan jaringan periodontal, sehingga pada penelitian ini dilakukan pengamatan pada *marker-marker* untuk reaksi inflamasi dan aktivitasnya terhadap kerusakan tulang alveolar. Pemeriksaan yang dilakukan pada penelitian ini meliputi kadar MDA yang menunjukkan aktivitas ROS, jumlah osteoblas, jumlah osteoklas, ekspresi RANKL dan OPG pada gigi dengan dan tanpa pergerakan ortodonti. Dengan dilakukannya penelitian ini akan memberikan kontribusi dari penggunaan *ERW* dalam penatalaksanaan penderita periodontitis baik agresif maupun kronis.

Terimakasih pada semua pihak yang telah membantu peneliti sehingga laporan penelitian ini dapat diselesaikan dengan tepat waktu. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat pada bidang kedokteran gigi khususnya untuk pengelolaan penderita periodontitis agresif dan kronis.

Surabaya, 14 November 2018

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	
HALAMAN PENGESAHAN	
RINGKASAN	1
PRAKATA	2
DAFTAR ISI	3
DAFTAR TABEL	5
DAFTAR GAMBAR	6
DAFTAR LAMPIRAN	7
BAB 1. PENDAHULUAN	8
1.1 Latar Belakang	8
1.2 Rencana Target Capaian Tahunan	9
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Periodontitis	10
2.2 Periodontitis agresif	14
2.3 Periodontitis kronis	15
2.4 Kerusakan jaringan periodontal pada periodontitis	16
2.4.1 Mekanisme inflamasi pada penyakit periodontal	16
2.5 <i>Electrolyzed Reduced Water (ERW)</i>	18
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	20
3.1 Tujuan penelitian	20
3.2 Manfaat penelitian	20
BAB 4. METODE PENELITIAN	21
4.1 Kultur bakteri <i>A.actinomycescomitans</i> serotipe b	21
4.2 Kultur <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	21
4.3 Persiapan <i>Electrolyzed Reduced Water</i>	21
4.4 Induksi bakteri <i>A.actinomycescomitans</i> serotipe b	22

4.5 Induksi bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	22
4.6 Pemberian ERW pada tikus Wistar dengan periodontitis	22
4.7 Pemeriksaan jumlah osteoblast dan osteoklas dengan pewarnaan HE	22
4.8 Pemeriksaan ekspresi RANKL dan OPG dengan imunohistokimia	23
4.9 Pengukuran aktivitas ROS	26
4.10 Kerangka Operasional Penelitian	27
4.11 Indikasi Capaian Tahunan	28
4.12 Luar Penelitian	28
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	29
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	44
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	49

DAFTAR TABEL

2.1	Klasifikasi Periodontitis Menurut <i>American Academy of Periodontology</i>	11
2.2	Perbedaan Periodontitis dan Agresif	13
5.1	Rerata-rata kadar MDA pada Tikus Wistar dengan Periodontitis Kronis dengan Konsumsi ERW dan Air Mineral	28
5.2	Rerata-rata kadar MDA pada Tikus Wistar dengan Periodontitis Agresif dengan Konsumsi ERW dan Air Mineral	30
5.3	Rerata-rata Jumlah Osteoblas pada Tikus Wistar dengan Periodontitis Kronis dengan Konsumsi ERW dan Air Mineral	31
5.4	Rerata-rata Jumlah Osteoblas pada Tikus Wistar dengan Periodontitis Agresif dengan Konsumsi ERW dan Air Mineral	32
5.5	Rerata-rata Jumlah Osteoklas pada Tikus Wistar dengan Periodontitis Kroni dengan Konsumsi ERW dan Air Mineral	33
5.6	Rerata-rata Jumlah Osteoklas pada Tikus Wistar dengan Periodontitis Agresif dengan Konsumsi ERW dan Air Mineral	34
5.7	Nilai Rerata dan Standar Deviasi hasil Pemeriksaan Jumlah Osteoklas	35
5.8	Uji Normalitas Jumlah Osteoklas	36
5.9	Uji <i>T-test</i> Jumlah Osteokla	36
5.10	Nilai Rerata dan Standar Deviasi (SD) Ekspresi RANKL Pada Kelompok Kontrol (K) dan Kelompok Perlakuan (P)	37
5.11	Nilai Uji Normalitas Ekspresi RANKL	38
5.12	Perbedaan Bermakna Ekspresi RANKL Antara Kelompok Penelitian hari ke 5 dan ke 7	39
5.13	Nilai Rerata dan Standar Devisi Hasil Pemeriksaan Jumlah Ekspresi OPG	39
5.14	Nilai Uji Normalitas EKspresi OPG	40
5.15	Perbedaan Eksresi OPG Antara Kelompok Penelitian Pada Hari ke 3, ke 5, dan ke 7	42

DAFTAR GAMBAR

	Hal.
2.1.1 Etiologi periodontitis yang merupakan penyakit multifaktorial	12
2.2 Mekanisme inflamasi pada penyakit periodontal	17
2.3 Skema dari sistem elektrolisis air untuk menghasilkan ERW	19
4.1 Garis besar kerangka operasional penelitian	27
5.1 Grafik kadar MDA pada tikus Wistar dengan periodontitis kronis dengan konsumsi ERW dan air mineral	29
5.2 Grafik kadar MDA pada tikus Wistar dengan periodontitis agresif dengan konsumsi ERW dan air mineral	30
5.3 Grafik jumlah osteoblas pada tikus Wistar periodontitis kronis dengan konsumsi ERW dan air mineral	31
5.4 Grafik jumlah osteoblas pada tikus Wistar periodontitis agresif dengan konsumsi ERW dan air mineral	32
5.5 Grafik jumlah osteoklas pada tikus Wistar periodontitis kronis dengan konsumsi ERW dan air mineral	33
5.6 Grafik jumlah osteoklas pada tikus Wistar periodontitis agresif dengan konsumsi ERW dan air mineral	34
5.7 Grafik rerata jumlah osteoklas pada sel jaringan alveolar masing-masing kelompok	35
5.8 Pewarnaan HE pada kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P)	37
5.9 Grafik rerata ekspresi RANKL pada sel osteoklas jaringan tulang alveolar masing-masing kelompok	38
5.10 Pewarnaan IHC pada kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P)	39
5.11 Grafik rerata ekspresi OPG pada osteoblas jaringan tulang alveolar masing-masing kelompok	41
5.12 Pewarnaan IHC pada kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P): A.K3 B.P3 C.K5 D.P5 E.K7 F.P7	42

DAFTAR LAMPIRAN

1. Naskah Publikasi Jurnal Internasional pada Jurnal Tropical Journal of Pharmaceutical Research berjudul *Effect of electrolyzed reduced water on malondialdehyde levels and neutrophil cells in aggressive periodontitis* published Februari 2018
2. Bukti Submit Naskah Publikasi Jurnal pada Jurnal European Journal of Dentistry pada tanggal 3 Mei 2018, under review pada tanggal 7 Juni 2018
3. Bukti Submit Naskah Publikasi pada Jurnal Tropical Journal of Pharmaceutical Research pada tanggal 8 Juni 2018, under review pada tanggal 26 Juli 2018

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Periodontitis merupakan penyakit multifaktorial, etiologi periodontitis merupakan interaksi antara plak gigi pada subgingiva yang mengandung bakteri patogen penyebab periodontitis dan *host*. Bakteri patogen penyebab periodontitis dipengaruhi oleh kebersihan rongga mulut, adanya plak atau retensi makanan, dan diet. Sedangkan *host* dipengaruhi oleh adanya faktor genetik yang menentukan respons imun spesifik dan non spesifik, kebiasaan, faktor sosial dan fisik (Wolf *et al.*, 2004). Penyebab utama peradangan gingiva pada periodontitis adalah plak bakteri subgingiva meliputi bakteri obligat anaerobik gram negatif yaitu *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas* dan *Campylobacter* serta fakultatif anaerob gram negatif seperti *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* dan *Eikenella corrodens*. Periodontitis agresif berbeda dengan periodontitis kronis terutama pada : 1. kecepatan dan agresifitas penyakit ini pada individu yang sehat, 2. tiadanya akumulasi dari plak atau kalkulus, 3. adanya riwayat keluarga dan faktor genetik yang berpengaruh pada agresifitasnya (Novak, 2006). Pada tahap awal terjadinya periodontitis, terjadi peningkatan PMN yang sekaligus akan meningkatkan pengeluaran radikal bebas dalam proses fagositosis melawan infeksi. Pasien dengan penyakit periodontal mempunyai kadar PMN yang tinggi dan ROS yang berlebihan yang akan menyebabkan destruksi jaringan gingiva, ligamen periodontal dan tulang alveolar melalui berbagai cara termasuk merusak DNA dan merangsang pembentukan sitokin proinflamasi. Hal ini sekaligus menjelaskan bahwa keterlibatan ROS yang berlebihan berkaitan dengan kerusakan jaringan periodontal.

Electrolyzed Reduced Water (ERW) merupakan air yang bersifat alkalis, ERW tidak hanya memiliki pH tinggi dan ORP rendah, tetapi juga mengandung beberapa ion magnesium. Ion magnesium ini terbukti efektif untuk pencegahan berbagai penyakit (Sander, 2003). Magnesium di ERW memberi kontribusi pada efek antikanker. ERW akan menghambat angiogenesis pada tumor. Pada penelitian terdahulu didapatkan ERW memberikan keterlambatan pertumbuhan tumor dan rentang hidup akan diperpanjang secara signifikan. ERW juga menunjukkan penghambatan metastasis dengan mengurangi jumlah koloni sel kanker. Jumlah spesies oksigen reaktif (ROS) sangat berkurang ketika diberi asupan dengan ERW. Bahkan untuk tikus normal, asupan ERW akan merangsang keluarnya sitokin sistemik, seperti, Th1 (IFN- γ , IL-12) dan Th2

(IL-4, IL-5), hal ini menunjukkan efek immunomodulasi yang kuat. Air dapat mencapai pada setiap jaringan tubuh manusia dalam waktu 30 menit setelah minum. Bahkan mengalir melalui darah ke otak tanpa penghalang, dan hampir tidak ada efek samping. ERW merupakan cara yang ideal untuk menjaga kesehatan. Sampai saat ini penggunaan ERW masih belum banyak dipakai di bidang kedokteran gigi, oleh karena itu peneliti akan melakukan penelitian tentang penggunaan ERW ini khususnya dibidang kedokteran gigi agar dapat memberikan kontribusi untuk tindakan preventif atau kuratif pada penyakit di bidang kedokteran gigi. Pada penelitian ini akan dilakukan analisis dari pemberian asupan ERW pada kasus periodontitis kronis dan agresif yang prevalensinya tampak semakin meningkat.

1.2 Rencana Target Capaian Tahunan

No.	Jenis Luaran		Indikator Capaian		
			TS ¹	TS+1	TS+2
1	Publikasi Ilmiah ²	Internasional	reviewed	Accepted/published	Accepted/published
		Nasional Terakreditasi	reviewed	Accepted/published	Accepted/published
2	Pemakalah dalam temu ilmiah ³	Internasional	terdaftar	terdaftar	sudah dilaksanakan
		Nasional	terdaftar	sudah dilaksanakan	sudah dilaksanakan
3	<i>Invited speaker</i> dalam temu ilmiah ⁴	Internasional			
		Nasional			
4	<i>Visiting Lecturer</i> ⁵	Internasional			
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI) ⁶	Paten			
		Paten sederhana			
		Hak cipta			
		Merek Dagang			
		Rahasia Dagang			
		Indikasi Geografis			
		Perlindungan varietas tanaman			
6	Teknologi Tepat Guna ⁷	Perlindungan topografi sirkuit terpadu			
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/Rekayasa Sosial ⁸				
8	Buku Ajar (ISBN) ⁹		draft	draft	Editing/ sudah terbit
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT) ¹⁰				

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 PERIODONTITIS

Periodontitis merupakan penyakit inflamasi kronik rongga mulut yang umum dijumpai. Penyakit ini ditandai dengan destruksi jaringan lunak dan jaringan tulang rongga mulut. Klasifikasi penyakit periodontal berdasarkan *International Workshop for a Classification of Periodontal Disease and Conditions*, 1999 didasarkan pada macam infeksi atau respon *host*. Semua klasifikasi tergantung pada lama dan kecepatan kerusakannya. Kategori I dan II merupakan penyakit periodontal dengan prevalensi yang tinggi. Kategori I meliputi penyakit gingival, dan kategori II terdiri dari bentuk periodontitis kronis.

Periodontitis didefinisikan sebagai penyakit inflamasi pada jaringan penyangga gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik atau sekelompok mikroorganisme, sehingga menghasilkan kerusakan pada jaringan periodontal dan tulang alveolar dengan adanya pembentukan poket, resesi gingiva atau keduanya. Secara klinis periodontitis ditandai dan dapat dideteksi dengan kehilangan perlekatan jaringan periodontal diikuti dengan pembentukan poket periodontal dan tingginya resorpsi tulang alveolar (Novak, 2006).

Periodontitis kronis banyak ditemukan pada orang dewasa, namun istilah kronis tidak berarti tidak dapat disembuhkan. Periodontitis agresif (lokal atau general) digolongkan dalam kategori III meliputi kerusakan yang berat tetapi tidak tergantung pada usia. Kategori ini termasuk *early onset periodontitis (prepubertal, juvenile, dan periodontitis progresif)*. Kategori IV adalah yang dikaitkan dengan penyakit sistemik, kategori V dengan abses, kategori VI periodontitis yang dihubungkan dengan lesi endodontik dan kategori VII dengan perubahan bentuk (Armitage, 2002).

Menurut *American Academy of Periodontology* pada tahun 2000 periodontitis diklasifikasikan menjadi periodontitis kronis, periodontitis agresif dan periodontitis sebagai manifestasi penyakit sistemik yang dapat dilihat pada tabel 2.1. Karakteristik periodontitis agresif adalah perkembangan penyakit yang berjalan cepat pada individu sehat, tidak terdapat akumulasi plak dan kalkulus dalam jumlah banyak, dan sering terjadi dalam satu keluarga yang mengindikasikan bahwa faktor genetik berperan pada penyakit ini (Newman *et al.*, 2006)

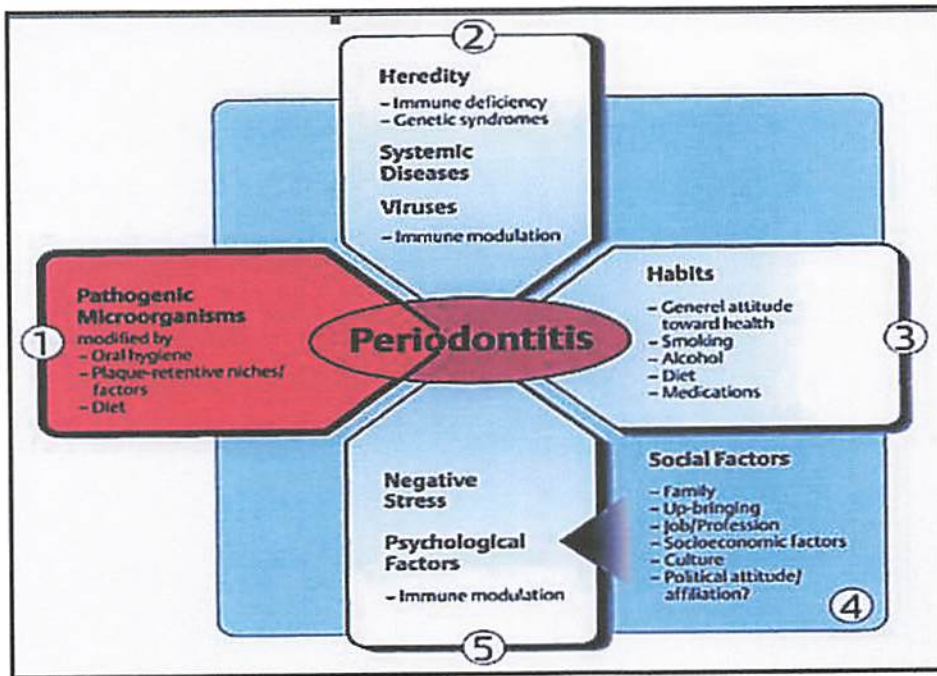
Tabel 2.1 Klasifikasi periodontitis menurut *American Academy of Periodontology* (Thomas,2004)

Classification of periodontitis (American Academy of Periodontology, 2000)	
Classification Strata	Description
Aggressive Periodontitis	An otherwise clinically healthy patient -Rapid attachment loss and bone destruction -Amount of microbial deposits inconsistent with disease severity -Familial aggregation of diseased individuals
Chronic periodontitis	Amount of destruction consistent with local factors -Slow to moderate rate of progression -prevalent in adults but can occur in children-Possibly modified by systemic diseases(diabetes),environmental factors(cigarette smoking)
Periodontitis associated with systemic disease	-Hematologic disorders Acquired neutropenia Leukemias -Genetic disorders Down syndrome Papillon-Lefevre syndrome Chediak-Higashi syndrome Familial and cyclic neutropenia Leukocyte adhesion deficiency syndrome

Dahulu penyakit periodontitis agresif disebut sebagai periodontosis karena etiologinya masih belum diketahui dengan jelas, diduga berkaitan dengan faktor genetik dan keberadaan bakteri *A.actinomyetemcomittans*. Keberadaan bakteri *A.actinomyetemcomitans* ditunjukkan dengan bukti-bukti sebagai berikut (Newman *et al.*, 2006) :

1. *A.actinomyetemcomitans* dominan pada penyakit periodontitis agresif dengan frekuensi sekitar 90 % dibanding pada periodontitis kronis hanya 21 % dan pada individu sehat sekitar 17 %.
2. Penyakit periodontitis agresif sering dihubungkan dengan peningkatan bakteri *A.actinomyetemcomitans*.
3. Pada pemeriksaan kilnis ada hubungan antara penurunan jumlah bakteri *A.actinomyetemcomitans* dengan keberhasilan perawatan.
4. *A.actinomyetemcomitans* mempunyai sejumlah faktor virulensi yang membantu progresifitas penyakit.

Periodontitis merupakan penyakit multifaktorial, etiologi periodontitis merupakan interaksi antara plak gigi pada subgingiva yang mengandung bakteri patogen penyebab periodontitis dan *host*. Bakteri patogen penyebab periodontitis dipengaruhi oleh kebersihan rongga mulut, adanya plak atau retensi makanan, dan diet. Sedangkan *host* dipengaruhi oleh adanya faktor genetik yang menentukan respons imun spesifik dan non spesifik, kebiasaan, faktor sosial dan fisik (Wolf *et al.*, 2004). Etiologi periodontitis dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Etiologi periodontitis yang merupakan penyakit multifaktorial (Wolf *et al.*, 2004)

Penelitian terdahulu pada beberapa dekade ditujukan pada identifikasi bakteri patogen pada jaringan periodontal. Kriteria klasik yang digunakan untuk identifikasi bakteri patogen adalah postulat Koch tetapi sulit untuk diterapkan pada penyakit periodontal. Alasan kesulitannya meliputi ketidakmampuan untuk melakukan penanaman bakteri yang berhubungan dengan penyakit ini, adanya bakteri suspek patogen pada individu sehat, kesulitan untuk identifikasi dan penanaman pada daerah dengan penyakit yang progresif aktif dan kurangnya model hewan coba untuk penelitian periodontitis. Sebagai alternatif menempatkan kriteria untuk menentukan bakteri patogen pada jaringan periodontal terdiri dari hal-hal di bawah ini :

1. Berhubungan dengan penyakit ini didasarkan pada peningkatan jumlah bakteri patogen.
2. Pengurangan atau penurunan jumlah bakteri patogen pada tempat yang diterapi ditunjukkan dengan kembali pada keadaan sehat secara klinis.
3. Adanya respons dari *host* terhadap bakteri patogen yaitu imunitas humoral dan selular.
4. Adanya faktor virulensi dari bakteri yang berpotensi menyebabkan kerusakan jaringan periodontal. Sesuai dengan kriteria diatas, dua bakteri periodontal *A. actinomycetemcomitans* dan *P. gingivalis* merupakan bakteri utama yang berperan pada periodontitis. (Haake *et al.*, 2006). Gambar 2.8 dan 2.9 menunjukkan patogenesis

periodontitis. Perbedaan periodontitis kronis dan periodontitis agresif dapat dilihat pada tabel 2.2

Tabel 2.2 Perbedaan periodontitis kronis dan agresif

No.	Periodontitis Kronis	Periodontitis Agresif
1.	Terjadi pada orang dewasa, namun dapat juga terjadi pada anak-anak.	Biasanya terjadi pada pasien yang secara klinis sehat.
2.	Jumlah kerusakan tulang sebanding dengan faktor lokal.	Jumlah deposit mikroba tidak sebanding dengan keparahan penyakit.
3.	Berhubungan dengan beberapa pola mikroba.	Terdapat hubungan keluarga pada pasien yang menderita periodontitis agresif.
4.	Biasanya ditemukan kalkulus subgingiva. Penyebab utama adalah bakteri <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Area penyakit diinfeksi oleh <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> .
5.	Proses perkembangan penyakit yang lambat-sedang dengan kemungkinan adanya masa periode cepat.	Kerusakan tulang dan kehilangan perlekatan yang cepat.
6.	Dapat dimodifikasi atau berhubungan dengan : Penyakit sistemik seperti DM dan HIV. Faktor lokal yang mempengaruhi terjadinya periodontitis. Faktor lingkungan seperti merokok dan stress emosional.	Lokalisata : Terjadi pada usia sekitaran pubertas. Lokalisata pada molar pertama dan insisivus dengan kehilangan perlekatan pada paling sedikit dua gigi permanen, yang salah satunya adalah molar pertama. Respon serum antibody yang sehat terhadap agen infeksi.
7.	Dapat disubklasifikasikan menjadi : Lokalisata : melibatkan <30% gigi yang terlibat. Generalisata : melibatkan >30% gigi	Generalisata : Biasanya terkena pada pasien yang berusia dibawah 30 tahun, walau dapat juga terjadi pada pasien yang lebih

	<p>yang terlibat.</p> <p>Ringan : 1-2 mm <i>clinical attachment loss</i>.</p> <p>Sedang : 3-4 mm <i>clinical attachment loss</i>.</p> <p>Berat : ≥ 5 mm <i>clinical attachment loss</i>.</p>	<p>tua.</p> <p>Generalisata melibatkan paling sedikit tiga gigi permanen selain molar pertama dan insisivus.</p> <p>Respon serum antibodi yang kurang terhadap agen infeksi.</p>
8.		Terdapat keabnormalan pada fungsi fagosit.
9.		Makrofag yang hiperresponsif, menghasilkan peningkat PGE ₂ dan IL-1 β .

(Newman *et al.*,2012)

2.2 PERIODONTITIS AGRESIF

Periodontitis agresif diketahui dari periodontitis kronis dengan tiga (3) faktor utama yaitu :

1. Keparahan penyakit tidak konsisten dengan keberadaan faktor lokal yaitu plak dan kalkulus
2. Kerusakan jaringan secara progresif berlangsung cepat
3. Sering terdapat pola kekerabatan pada keberadaan periodontitis agresif, faktor genetik berperan signifikan pada kepekaan penyakit ini (Haake *et al.*, 2006)

Periodontitis agresif paling banyak dihubungkan dengan *A.actinomycescomitans*, penderita dengan periodontitis agresif menunjukkan abnormalitas PMN, atau respons berlebihan dari makrofag yang menghasilkan peningkatan mediator yang menyebabkan kerusakan jaringan, seperti prostaglandin dan IL-1 β .

Periodontitis agresif dikelompokkan menjadi dua (2) kelompok yaitu :

1. Periodontitis lokal (*Localized Aggressive Periodontitis / LAP*)
2. Periodontitis agresif menyeluruh (*Generalized Aggressive Periodontitis / GAP*)

LAP banyak dijumpai pada awal masa pubertas dan meliputi pada gigi I₁ dan M₁, dan menunjukkan respons antibodi yang tinggi pada penderita dari infeksi bakteri ini. GAP biasanya ditemukan pada penderita dibawah usia 30 tahun dan meliputi paling sedikit 3 gigi lain selain gigi I₁ dan M₁, pada penderita menunjukkan respons antibodi yang rendah karena infeksi bakteri ini. Pemeriksaan radiologis pada LAP memperlihatkan adanya kerusakan tulang alveolar arah

vertikal dan spesifik berupa gambaran busur panah pada area apeks I₁ atau M₁. Pada GAP sangat bervariasi tergantung pada luas kerusakan yang terjadi, terlihat kerusakan tulang parah pada sejumlah gigi, hingga kerusakan tulang yang lanjut dan mengenai sebagian besar atau hampir seluruh gigi. Kerusakan tulang alveol pada periodontitis agresif sangat cepat, penelitian terdahulu menunjukkan kerusakan yang semula seluas 25%, dalam periode 9 bulan menjadi 60%. Sebagai pembandingan kerusakan tulang alveolar yang umum terjadi pada individu dengan jaringan periodontal sehat adalah sebesar 0,1 - 0,2 mm dalam periode waktu 1 tahun (Meyer *et al.*, 2004; Newman *et al.*, 2006; Kinane *et al.*, 2007).

Periodontitis agresif berbeda dengan periodontitis kronis terutama pada : 1. kecepatan dan agresifitas penyakit ini pada individu yang sehat, 2. tiadanya akumulasi dari plak atau kalkulus, 3. adanya riwayat keluarga dan faktor genetik yang berpengaruh pada agresifitasnya (Novak, 2006).

Faktor genetik dan suku bangsa dipercaya memegang peranan penting pada terjadinya kelainan periodontitis agresif ini. Angka kejadian pada orang Afrika menunjukkan bahwa mereka rentan terhadap terjadinya periodontitis agresif yaitu sebesar 10% dan merokok merupakan faktor resiko terjadinya kelainan ini (Levin *et al.*, 2006).

Terapi pada periodontitis agresif non bedah dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu terapi yang ditujukan pada komponen dan produk bakteri, dengan melakukan mekanikal terapi dengan pemberian antimikroba atau antiseptik, terapi yang ditujukan pada *host* diberikan preparat anti inflamasi non steroid (NSAID) untuk jaringan periodontal.

2.3 PERIODONTITIS KRONIS

Periodontitis kronis merupakan penyakit peradangan pada jaringan periodontal yang disebabkan terutama oleh bakteri spesifik pada subgingiva, yang dapat menimbulkan respon inflamasi gingiva, dan berlanjut ke struktur jaringan penyangga gigi yaitu sementum, ligamentum periodontal dan tulang alveolar. Keadaan ini mengakibatkan hilangnya perlekatan gingiva dan terjadinya kerusakan tulang alveolar lebih dalam, pembentukan poket periodontal, migrasi patologis yang menimbulkan diastema, dan kegoyangan gigi yang dapat berakibat tanggalnya gigi (Newman, 2012). Penyebab utama peradangan gingiva pada periodontitis adalah plak bakteri subgingiva meliputi bakteri obligat anaerobik gram negatif yaitu *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*,

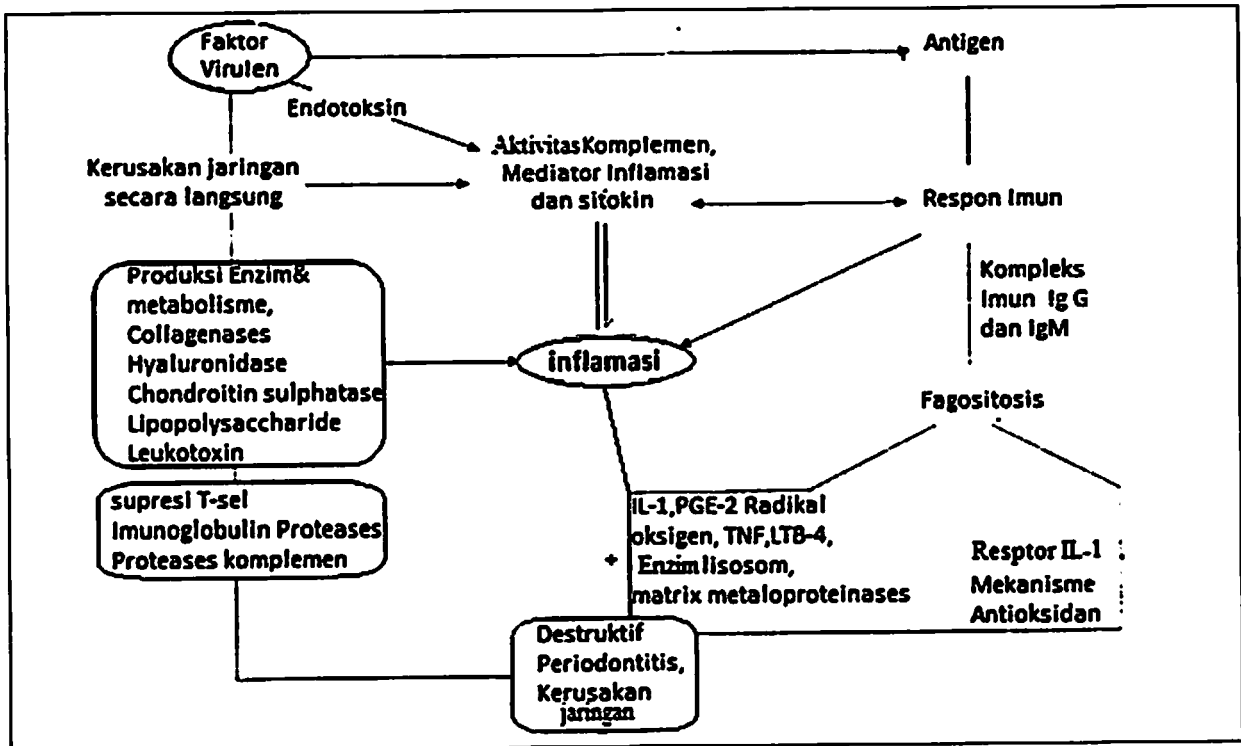
Selenomonas dan *Campylobacter* serta fakultatif anaerob gram negatif seperti *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* dan *Eikenella corrodens*. Periodontitis kronis merupakan inflamasi pada jaringan periodontal dengan prevalensi terbanyak pada penderita dewasa pada usia diatas 35 tahun tetapi dapat juga dijumpai pada anak-anak. Periodontitis kronis dihubungkan dengan plak dan kalkulus, tetapi pada umumnya tingkat pengembangan penyakitnya lambat atau sedang dan kecepatan kerusakan jaringan periodontal dan tulang alveolar dapat diamati. Kecepatan kerusakan yang terjadi pada periodontitis kronis kemungkinan disebabkan oleh faktor lokal, sistemik, atau faktor lingkungan yang mempengaruhi interaksi kondisi normal dari *host* dengan bakteri.

2.4 KERUSAKAN JARINGAN PERIODONTAL PADA PERIODONTITIS

2.4.1 Mekanisme Inflamasi Pada Penyakit Periodontal

Penyakit periodontal adalah penyakit yang bersifat multifaktorial. Salah satu etiologinya adalah adanya *reactive oxygen species* yang distimulasikan oleh antigen bakteri. Etiologi utama penyakit periodontal adalah bakteri anaerob fakultatif gram negatif yang terdapat di dalam lapisan biofilm subgingiva. Bakteri ini mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan mekanisme pertahanan pejamu dalam memperbaiki jaringan yang rusak tetapi dalam waktu yang bersamaan, bakteri ini akan memproduksi toksin yang akan menghancurkan epitel dan struktur jaringan periodontal. Bila organisme terpapar dengan serangan bakteri, hal tersebut akan memicu respons imun antara patogen bakteri dan pejamu. Bakteri tersebut akan menyebabkan pelepasan sitokin seperti interleukin-6 (IL-6) dan *tumor necrosis factor- α* lpha (TNF- α), sehingga meningkatkan jumlah produksi polimorfonuklear leukosit (PMN). Leukosit adalah sel pertama yang akan melawan bakteri patogen yang menyerang jaringan periodonsium. Pada tahap awal terjadinya periodontitis, terjadi peningkatan PMN yang sekaligus akan meningkatkan pengeluaran radikal bebas dalam proses fagositosis melawan infeksi. Pasien dengan penyakit periodontal mempunyai kadar PMN yang tinggi dan ROS yang berlebihan yang akan menyebabkan destruksi jaringan gingiva, ligamen periodontal dan tulang alveolar melalui berbagai cara termasuk merusak DNA dan merangsang pembentukan sitokin proinflamasi. Hal ini sekaligus menjelaskan bahwa keterlibatan ROS yang berlebihan berkaitan dengan kerusakan jaringan periodonsium. Proses inflamasi dapat menyebabkan destruksi jaringan periodonsium. Pada awalnya, PMN yang diproduksi memiliki peran protektif terhadap jaringan periodonsium.

Namun PMN yang secara fungsional diaktifkan akan menunjukkan peningkatan produksi radikal bebas. Produksi prostaglandin juga meningkat karena stimulasi dari bakteri patogen gram negatif. Dalam mencapai kestabilan antara inflamasi dan sistem kekebalan tubuh, bakteri patogen secara langsung juga telah menyebabkan kerusakan pada jaringan periodonsium. Enzim-enzim seperti collagenase, hyaluronidase dan elastase juga turut berperan dalam kerusakan sel dan jaringan periodonsium sebagai efek dari mekanisme kerja dari enzim tersebut sehingga dalam hal ini dapat disimpulkan bahwa sistem imun, fagositosis maupun enzim merupakan faktor yang menyebabkan terjadinya inflamasi sehingga menimbulkan destruksi terhadap jaringan periodontal. Mekanisme inflamasi pada penyakit periodontal ini dapat ditunjukkan dalam gambar 2.2



Gambar 2.2 Mekanisme inflamasi pada penyakit periodontal

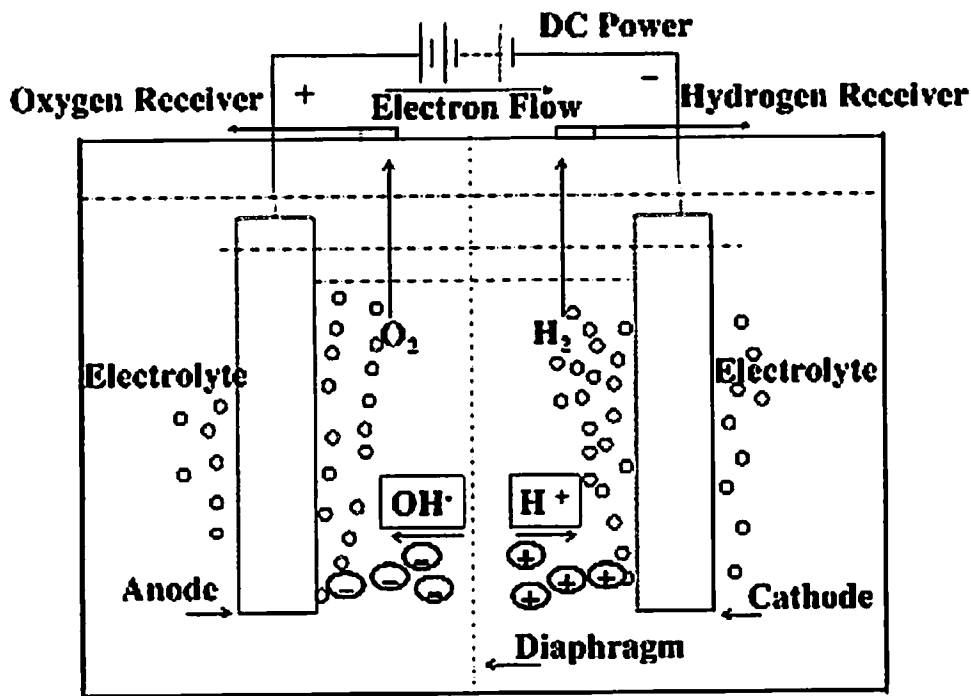
2.5 ELECTROLYZED REDUCED WATER(ERW)

Mineral tertentu dapat menghasilkan *electrolyzed reduced water (ERW)* dengan pH tinggi dan potensial oksidasi-reduksi (ORP) rendah ketika dilarutkan dalam air. (ERW) menunjukkan efek antikanker yang signifikan. Ketika sel-sel melanoma B16 diinokulasi secara subkutan dan intra-peritoneal dan tikus diberi makan dengan ERW menunjukkan keterlambatan pertumbuhan tumor dan rentang hidup diperpanjang secara signifikan. ERW juga menunjukkan penghambatan metastasis dengan mengurangi jumlah koloni melanoma B16 ketika disuntikkan melalui vena ekor. Jumlah spesies oksigen reaktif (ROS) sangat berkurang ketika diberi makan dengan ERW kecuali pada limpa, yang merupakan organ utama untuk kekebalan. Bahkan untuk tikus normal, asupan ERW akan merangsang keluarnya sitokin sistemik, seperti, Th1 (IFN- γ , IL-12) dan Th2 (IL-4, IL-5), hal ini menunjukkan efek immuno-modulasi yang kuat. Efek ROS dan efek immunomodulasi akan bertanggung jawab untuk efek antikanker ERW (Lee *et al.*,2010) ERW dengan pH tinggi dan potensi redoks negatif yang signifikan memiliki aktivitas seperti SOD dan aktivitas seperti katalase dan dengan demikian akan mengeluarkan ROS dan melindungi DNA dari kerusakan oleh radikal oksigen in vitro. ERW sebenarnya bertindak sebagai antioksidan dan melindungi DNA dari kerusakan, asupan ERW menunjukkan efek antikanker. Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Hofman dan Shah pada tahun 200 dan 2002 menunjukkan efek antikanker dari ERW. Asupan ERW memperlambat pertumbuhan tumor, dan menghambat metastasis intravena, menyebabkan berkepanjangan tikus akan mempunyai rentang hidup yang panjang pada saat disuntik dengan sel melanoma B16. Sel melanoma B16 merupakan salah satu tumor yang paling sering di manusia dan ditandai oleh kapasitas tinggi untuk invasi dan metastasis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ERW tidak hanya bertindak sebagai antioksidan, tetapi juga bertindak sebagai immuno-modulator kuat, keduanya bertanggung jawab untuk antikanker. Dengan demikian, ERW diharapkan efektif untuk berbagai penyakit akibat kekebalan rendah dan / atau spesies dengan oksigen reaktif tinggi serta untuk pencegahan kanker (Hofmann *et al.*, 2000 ; Shah *et al.*, 2002).

ERW tidak hanya memiliki pH tinggi dan ORP rendah, tetapi juga mengandung beberapa ion magnesium. Ion magnesium ini terbukti efektif untuk pencegahan berbagai penyakit (Sander, 2003). Magnesium di ERW memberi kontribusi pada efek antikanker. Air mencapai setiap jaringan tubuh manusia dalam waktu 30 menit setelah minum. Bahkan mengalir

melalui darah ke otak tanpa penghalang, dan hampir tidak ada efek samping. ERW merupakan cara yang ideal untuk menjaga kesehatan.

Cara kerja alat penghasil ERW dapat dilihat pada gambar 2.3 di bawah ini.



Gambar 2.3 Skema dari sistem elektrolisis air untuk menghasilkan ERW

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya adalah :

1. Menganalisis pengaruh *electrolyzed reduced water* pada beberapa indikator inflamasi pada kondisi periodontitis agresif dan kronis yaitu dengan melakukan pemeriksaan pada jumlah beberapa sel radang
2. Menganalisis pengaruh *electrolyzed reduced water* pada aktivitas ROS pada kondisi periodontitis agresif dan kronis dengan melakukan pengukuran kadar MDA
3. Menganalisis pengaruh penggunaan *electrolyzed reduced water* pada terjadinya kerusakan tulang di jaringan periodontal pada kondisi periodontitis agresif dan kronis dengan melakukan pengukuran jumlah osteoblas dan osteoklas.

BAB 3 : TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Menganalisis pengaruh *electrolyzed reduced water* pada proses inflamasi pada kondisi periodontitis
2. Menganalisis pengaruh *electrolyzed reduced water* pada jumlah osteoblas dan osteoklas, ekspresi RANKL dan OPG pada kondisi periodontitis
3. Menganalisis pengaruh *electrolyzed reduced water* pada aktivitas ROS pada kondisi periodontitis
4. Menganalisis mekanisme pengaruh penggunaan *electrolyzed reduced water* terhadap terjadinya kerusakan jaringan periodontal dan tulang alveolar pada kondisi periodontitis

3.2 Manfaat Penelitian:

Dengan mengetahui kemampuan *electrolyzed reduced water* terhadap *biomarker* kerusakan jaringan periodontal pada kondisi periodontitis agresif dan kronis maka diharapkan *electrolyzed reduced water* akan dapat dipergunakan sebagai salah satu material untuk pengelolaan penderita periodontitis agresif dan kronis yang prevalensinya semakin meningkat.

H I L I K
P E R P U S T A K A A N
U N I V E R S I T A S A I R L A N G G A
S U R A B A Y A

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Kultur bakteri *A.actinomycescomitans* serotipe b strain Y4 ATCC 43718

Stok bakteri dari *A.actinomycescomitans* serotipe b strain Y4 ATCC 43718 dilakukan penanaman ulang pada media Luria Berthani (LB) selama 2 / 3 hari sehingga tampak gambaran morfologi dari bakteri tersebut (dibuat dalam 2 plat agar). Mempersiapkan kultur *A.actinomycescomitans* masing-masing sebanyak 200 µl untuk 3 kelompok hewan coba (30 ekor tikus) sehingga dipersiapkan kultur minimal sebanyak 5 ml dengan kepadatan *A.actinomycescomitans* adalah sebesar 10^8 .

4.2 Kultur bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

Bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 ditumbuhkan dalam media yang mengandung *tryptic soy broth* (TSB). Kemudian diinkubasi dalam suasana anaerob selama 24 jam. Selanjutnya ditanam dalam media *blood agar* yang mengandung hemindan vitamin K. Dimasukkan dalam inkubator anaerob selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni terbesar dipindahkan dalam medium cair yang mengandung thioglikolat, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam suasana anaerob. Setelah itu ditambahkan PBS, kemudian dengan spektrofotometri panjang gelombang 624 nm, dibuat konsentrasi bakteri sebanyak 1×10^6 cfu.

4.3 Persiapan *Electrolyzed Reduced Water*

ERW adalah air dengan pH tinggi yang diproduksi oleh suatu alat dengan potensial reduksi oksidasi, 600 mV; PH 10 yang disiapkan oleh *electrolyzing* air ultra murni yang mengandung 0.002M NaOH pada 100 V selama 60 menit menggunakan perangkat *electrolyzing* dilengkapi dengan elektroda titanium berlapis platinum (TI-200s, Nihon Potong Co, Osaka, Jepang), dan biasanya mengandung 0,2 ppb Pt Nps ketika diuji dengan ICP-MS spektrometer (data tidak dipublikasikan). Sebuah jenis *batch electrolyzing* perangkat yang digunakan. Alat ini terdiri dari 4-l mm *vessel* dengan lebar tertentu, (panjang :190 -210 mm, tinggi : 40 mm) dibagi dengan membran semipermeabel (lebar 190 mm, tinggi 130 mm, 0,22 mm ketebalan, pori ukuran tidak diungkapkan, Yuasa Membran Sistem Co, Osaka Jepang). Dua elektroda (lebar 70 mm, panjang 110 mm) yang ditempatkan pada jarak 55 mm dari setiap sisi membran semipermeabel.

4.4 Induksi bakteri *A.actinomycetemcomitans* serotipe b strain Y4 ATCC 43718

Induksi bakteri *A.actinomycetemcomitans* serotipe b strain Y4 ATCC 43718 dilakukan pada daerah intrasulkuler di bagian bukal molar kanan atas tikus Wistar dan dilakukan sesuai metode Dumitrescu, 2006. Dosis yang diberikan untuk mendapatkan kondisi periodontitis agresif adalah sebesar 100 µg/ml selama 7 hari sehingga didapatkan gejala yang nyata.

4.5 Induksi bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 pada tikus Wistar

Induksi bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 dilakukan pada daerah intrasulkuler di bagian bukal molar kanan atas tikus Wistar dan dilakukan sesuai metode Dumitrescu, 2006. Dosis yang diberikan untuk mendapatkan kondisi periodontitis kronis adalah sebesar 50 µg/ml selama 7 hari sehingga didapatkan gejala yang nyata.

4.6 Pemberian *Electrolyzed Reduced Water* pada tikus Wistar dengan periodontitis kronis dan agresif

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah Tikus Wistar yang dibagi dalam 4 kelompok, masing-masing kelompok 10 ekor tikus. Pada kelompok 1 merupakan kelompok periodontitis kronis dan diberi minum dengan air mineral, kelompok ke-2 merupakan kelompok dengan periodontitis kronis dan diberi minum dengan *Electrolyzed Reduced Water* dan kelompok ke-3 adalah kelompok dengan periodontitis agresif dan diberi minum dengan air mineral dan kelompok ke-4 adalah kelompok dengan periodontitis agresif dan diberi minum dengan *Electrolyzed Reduced Water*. Asupan air mineral dan ERW diberikan sesuai dengan kebutuhan air minum sehari-hari untuk tikus Wistar umur 2 bulan dengan berat badan berkisar 200-300 gram. Asupan air yang diberikan sebesar 8-11 ml/100 BB per hari.

4.7 Pemeriksaan jumlah osteoblas dan osteoklas pada jaringan tulang alveolar dengan proses Pewarnaan *Hematoxilen-Eosin*

- a. *Slide* dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit.
- b. Kemudian diwarnai dengan hematoxilen selama 10 menit.
- c. Setelah itu, direndam dalam *tap water* selama 10 menit.
- d. Kemudian dibilas dengan dH₂O.

- e. Dilakukan dehidrasi dengan alkohol berseri 30% dan 50% masing-masing selama 5 menit.
- f. Kemudian diwarnai dengan larutan Eosin selama 3 menit.
- g. Setelah itu dibilas dengan alkohol 30%.
- h. Dicuci dengan dH₂O selama 5 menit dan dikering anginkan.
- i. Kemudian dilakukan *mounting* dengan entelan dan tutup dengan *cover glass*.

4.8 Pemeriksaan ekspresi RANKL dan OPG dengan tehnik Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan metoda yang digunakan untuk mendeteksi adanya Ag-Ab tertentu baik pada bahan yang berupa cairan maupun bahan yang berupa jaringan atau sel. Pada penelitian ini metode imunohistokimia untuk pemeriksaan ekspresi osteokalsin dengan tahapan sebagai berikut :

1. Tahapan pembuatan sediaan histopatologi menurut metode Humason, 1972 yang dikutip dari Sudiana, (2005).
2. Metode penghitungan terhadap hasil pewarnaan imunohistokimia menurut Soini *et al.*, 1998; Pizem and Cor, (2003).

Tahapan teknik imunohistokimia untuk pengamatan tersebut adalah:

1. Pembuatan sediaan parafin blok

- a. Jaringan dicuci dengan PBS 3-5 x untuk membersihkan dari kontaminan.
- b. Kemudian difiksasi pada formalin 10%.
- c. Setelah itu dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut) masing-masing 60 menit.
- d. Dilakukan *Clearing* menggunakan xilol 2 kali masing-masing 60 menit.
- e. Kemudian dilakukan infiltrasi dengan parafin lunak selama 60 menit pada suhu 48°C.
- f. Kemudian dilakukan *block* dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari.
- g. Keesokan harinya ditempelkan pada holder dan dilakukan pemotongan setebal 4-6 µm dengan *rotary microtome*.
- h. Dilakukan *mounting* pada gelas objek dengan gelatin 5%.

2. Proses Deparafinisasi

- a. Gelas obyek hasil *parafin block* direndam dalam xilol 2 kali masing-masing selama 5 menit.
- b. Setelah itu dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol berseri (absolut, 96%, 80%, 70%, 50% dan 30%) masing-masing selama 5 menit.
- c. Kemudian dibilas dalam dH₂O selama 5 menit.

3. Proses Pewarnaan *Hematoxilen-Eosin*

- j. *Slide* dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit.
- k. Kemudian diwarnai dengan hematoxilen selama 10 menit.
- l. Setelah itu, direndam dalam *tap water* selama 10 menit.
- m. Kemudian dibilas dengan dH₂O.
- n. Dilakukan dehidrasi dengan alkohol berseri 30% dan 50% masing-masing selama 5 menit.
- o. Kemudian diwarnai dengan larutan Eosin selama 3 menit.
- p. Setelah itu dibilas dengan alkohol 30%.
- q. Dicuci dengan dH₂O selama 5 menit dan dikering anginkan.
- r. Kemudian dilakukan *mounting* dengan entelan dan tutup dengan *cover glass*.

4. Pengamatan ekspresi IL-6 dan MMP-1 sebagai penanda pada tulang alveolar dengan imunohistokimia

- a. *Slide* dicuci dengan PBS pH 7,4 satu kali selama 5 menit.
- b. Bloking endogenous peroksida menggunakan 3% H₂O₂ selama 20 menit.
- c. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selam 5 menit.
- d. Bloking protein tidak spesifik menggunakan 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100.
- e. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit.
- f. Inkubasi menggunakan monoklonal anti NFκB (LabVision), selama 60 menit.
- g. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selam 5 menit.
- h. Inkubasi menggunakan anti mouse HRP conjugated selama 40 menit.
- i. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selam 5 menit.

- j. Tetesi dengan DAB (Diamino Benzidine) dan inkubasi selama 10 menit.
- k. Cuci menggunakan PBS pH 7,4 tiga kali, selama 5 menit.
- l. Cuci menggunakan dH₂O, selama 5 menit.
- m. *Counterstaining* menggunakan Mayer Hematoxilen yang diinkubasi selama 10 menit dan cuci menggunakan *tap water*.
- n. Bilas menggunakan dH₂O dan kering anginkan.
- o. *Mounting* menggunakan entelan dan tutup dengan cover glass.
- p. Amati pada mikroskop cahaya.

5. Metode Perhitungan terhadap hasil pewarnaan imunohistokimia dan histokimia

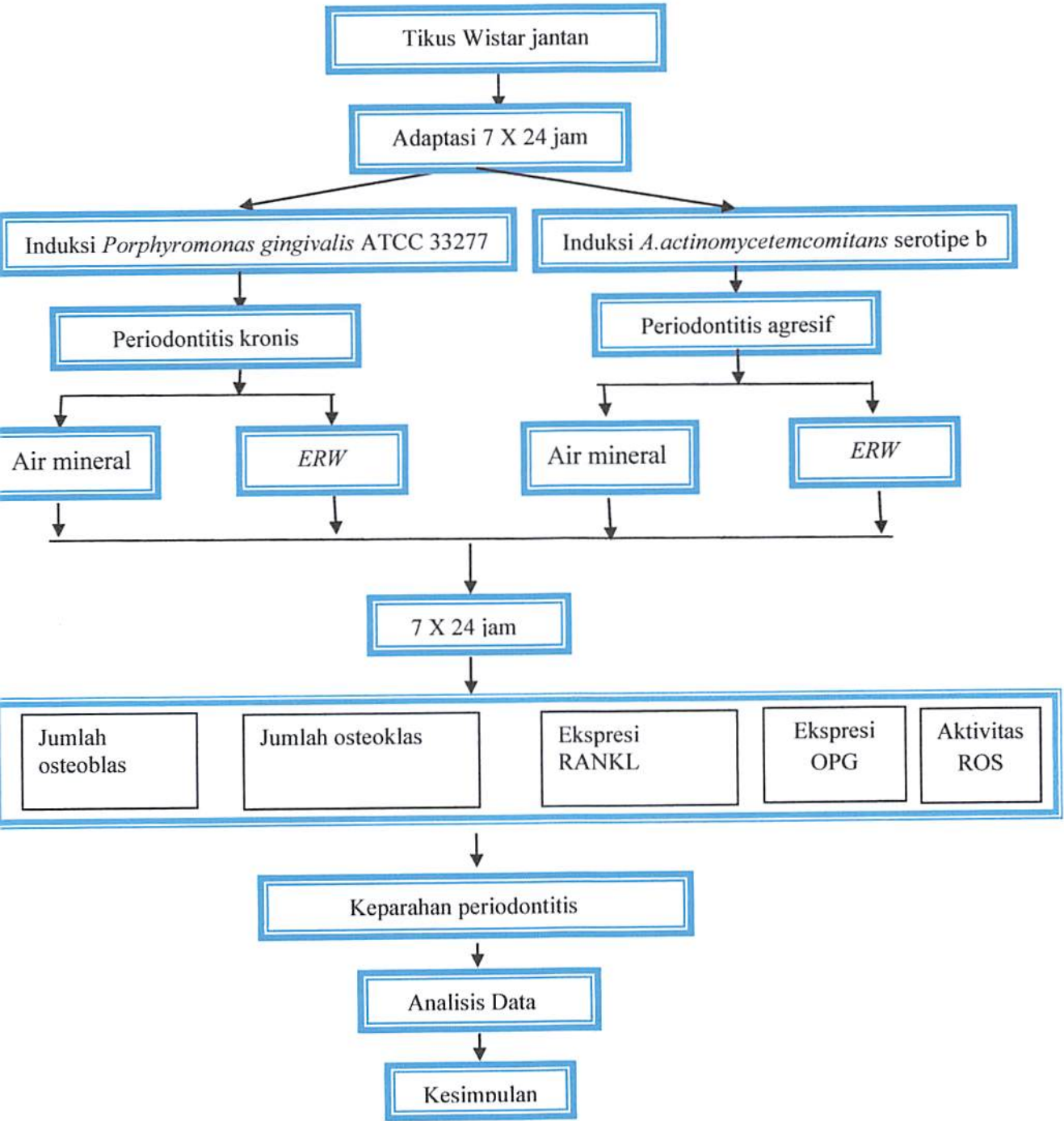
- a. Penelitian ini menggunakan jaringan epidermal tikus
- b. Dengan nilai konfiden interfal 90% dan kekuatan uji 80% maka didapatkan, bahwa masing-masing kelompok harus terdiri dari 10 sampel
- c. Terdapat 60 *slide* (jumlah *slide*), yang terdiri dari 10 slide x 6 kelompok pemeriksaan
- d. Setiap sampel jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4µm, kemudian dideteksi pemeriksaan *Hematoxilen-Eosin* pengamatan distribusi sel-sel imunokompeten (makrofag dan limfosit serta *mast cells*) dan pemeriksaan imunohistokimia terhadap fibronektin untuk melihat pertumbuhan sel-sel fibroblas
- e. Untuk keperluan perhitungan, *slide* yang sudah berkode ditutup nomer kodenya dan diberi nomer baru secara acak, sehingga pemeriksa tidak mengetahui *slide* yang diperiksa merupakan sampel kelompok apa (*Blind*)
- f. Pemeriksa terdiri dari 2 orang, masing-masing adalah:
 - g. Operator I
 - b. Operator II (peneliti).
- h. Pemeriksaan dan perhitungan sampel dilakukan secara terpisah antara kedua pemeriksa.
- i. Pemeriksaan dan perhitungan perkembangan sel fibroblas diamati ekspresinya dengan melihat adanya warna coklat pada membran sel, yang dihitung menurut Soini *et al*, 1998 dan Pizem and Cor, 2003 yang dimodifikasi untuk kepentingan sel fibroblas, masing-masing *slide* pada bidang pandang dengan perbesaran 1000x dan sebanyak 20 lapang pandang.

- j. Hasil setiap perhitungan ditulis pada lembar kerja dan diambil nilai rata-rata per lapang pandang
- k. Dilakukan pemulasan Hematoksin-Eosin yang digunakan sebagai penghitungan jumlah sel imunokompeten berdasarkan model struktural
- l. Analisis statistik bila semua hasil sudah dikembalikan ke kode sebenarnya
- m. Dalam rangka menjamin representasi dan mengurangi kesalahan hasil, diperlukan pengamatan pada kurang lebih sejumlah 20 lapang pandang dengan perbesaran 1000x yang masing-masing berisi lebih kurang 1500 sel (Soini *et al*, 1998; Pizem and Cor, 2003).

4.9 Pengukuran aktivitas ROS

Mekanisme kerusakan sel atau jaringan akibat serangan radikal bebas yang paling awal diketahui dan terbanyak diteliti adalah peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid paling banyak terjadi di membran sel, terutama asam lemak tidak jenuh yang merupakan komponen penting penyusun membran sel. Pengukuran tingkat peroksidasi lipid diukur dengan mengukur produk akhirnya, yaitu malondialdehyde (MDA), yang merupakan produk oksidasi asam lemak tidak jenuh dan yang bersifat toksik terhadap sel. Pengukuran kadar MDA merupakan pengukuran aktivitas radikal bebas secara tidak langsung sebagai indikator stres oksidatif. Pengukuran ini dilakukan dengan tes *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS test) (Slater, 1984; Powers and Jackson, 2008). Untuk mengukur kadar malondialdehyde menggunakan metode MDA/TBARS (*Malondialdehyde/Thiobarbituric Acid Reactif Substance*). Cara kerja dari metode ini adalah dengan mengambil jaringan gingival tikus Wistar dengan berat 1 gr lalu ditempatkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan PBS dingin sebanyak 9 ml lalu digerus dengan spatula. Cairan tersebut kemudian disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil sebanyak 4 ml dan ditambahkan larutan TCA 15% sebanyak 1 ml, kemudian ditambahkan 1 ml larutan TBA 0,37% dalam HCl 0,25 N dan dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 80°C selama 15 menit. Setelah didinginkan pada suhu ruang selama 60 menit lalu disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya nilai absorbansi dibaca terhadap warna merah yang terbentuk dengan menggunakan spektrofotometer dengan $\lambda = 532 \text{ nm}$.

4.10 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Garis besar kerangka operasional penelitian

4.11 Indikator Capaian Tahunan

Obyek penelitian	Indikator capaian	Metode	Luaran
Serum dan Jaringan gingiva	Kadar dan Ekspresi IL-1	Elisa dan Imunohistokimia	Kerusakan jaringan periodontal
Serum dan Jaringan	Kadar i dan Ekspres IL-6	Elisa dan Imunohistokimia	Kerusakan jaringan Periodontal
Serum dan Jaringan gingiva	Kadar dan Ekspresi IL-10	Elisa dan Imunohistokimia	Kerusakan jaringan periodontal
Serum dan Jaringan gingiva	Kadar dan Ekspresi MMP-1	Elisa dan Imunohistokimia	Kerusakan jaringan periodontal
Darah	Kadar ROS	Elisa	Kerusakan jaringan periodontal

4.12 Luaran penelitian

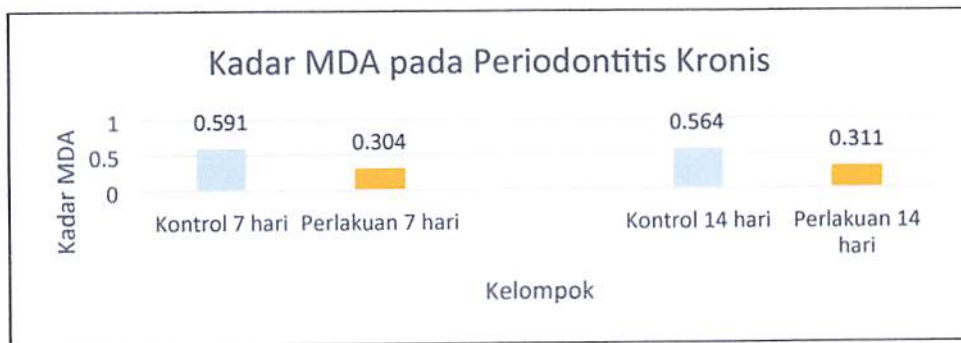
Luaran penelitian ini adalah : hasil penelitian yang telah dilakukan akan diterbitkan pada jurnal ilmiah internasional.

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Kadar MDA Pada Tikus Wistar Dengan Periodontitis Kronis Dengan Konsumsi ERW Dan Air Mineral.

Tabel 5.1 Rerata - rata kadar MDA pada Tikus Wistar dengan periodontitis kronis dengan konsumsi ERW dan air mineral

Kelompok	Kadar MDA	Standar Deviasi	Nilai uji Kolmogorof smirnov	Nilai levene test	Nilai P oneway ANOVA
Kontrol 7 Hari	0.591	0.032	0.644	0.193	0.000
Perlakuan 7 hari	0.304	0.026	0.991		
Kontrol 14 Hari	0.564	0.057	0.991		
Perlakuan 14 hari	0.311	0.033	0.999		



Gambar 5.1 Grafik kadar MDA pada tikus Wistar dengan periodontitis kronis dengan konsumsi ERW dan air mineral

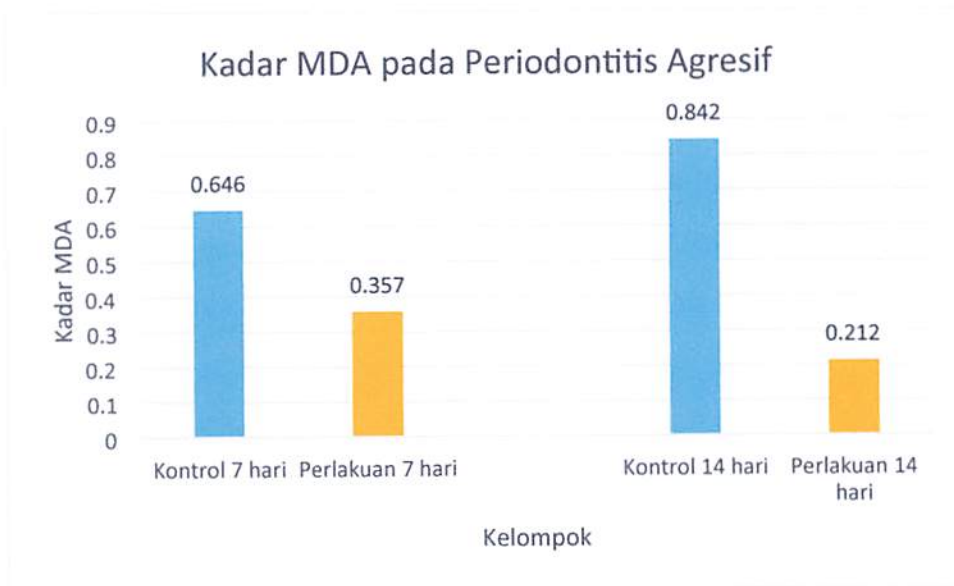
Nilai uji komogorof smirnov menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ($P < 0,05$) dan nilai levene test menunjukkan bahwa data homogen ($P > 0,05$) sehingga dapat dilanjutkan dengan uji beda oneway ANOVA

Hasil uji one way ANOVA menunjukkan nilai $P < 0,05$ sehingga disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan pada semua kelompok. Kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc tukey HSD untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok. Terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antara kelompok kontrol 7 hari dengan kelompok perlakuan 7 hari; serta kelompok kontrol 14 hari dan kelompok perlakuan 14 hari.

5.2. Kadar MDA Pada Tikus Wistar Dengan Periodontitis Agresif Dengan Konsumsi ERW Dan Air Mineral.

Tabel 5.2 Rerata-rata kadar MDA pada Tikus Wistar dengan periodontitis Agresif dengan konsumsi ERW dan air mineral

Kelompok	Kadar MDA	Standar Deviasi	Nilai uji Kolmogorof smirnov	Nilai levene test	Nilai P uji kruskal wallis
Kontrol 7 Hari	0.646	0.041	0.995	0.001	0.000
Perlakuan 7 hari	0.357	0.118	0.749		
Kontrol 7 Hari	0.842	0.066	0.930		
Perlakuan 7 hari	0.212	0.053	0.991		



Gambar 5.2 Grafik kadar MDA pada tikus Wistar dengan periodontitis Agresif dengan konsumsi ERW dan air mineral

Nilai uji komogorof smirnov menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ($P < 0,05$) dan nilai levene test menunjukkan bahwa data tidak homogen ($P < 0,05$) sehingga tidak dapat dilanjutkan dengan uji beda oneway ANOVA. Uji beda dilakukan dengan menggunakan uji kruskal wallis.

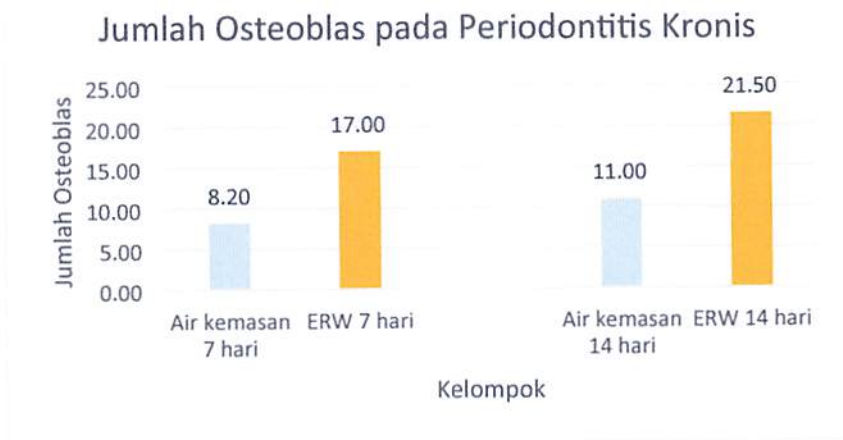
Hasil uji kruskal wallis menunjukkan nilai $P < 0,05$ sehingga disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan pada semua kelompok. Kemudian dilanjutkan dengan uji mann-witney untuk melihat perbedaan dua kelompok. Terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antara kelompok kontrol 7 hari dengan kelompok perlakuan 7 hari dan kontrol 14 hari; kelompok

control 14 hari dan kelompok perlakuan 14 hari; serta kelompok perlakuan 7 hari dan kontrol 14 hari.

5.3 Jumlah Osteoblas Pada Tikus Wistar Dengan Periodontitis Kronis Dengan Konsumsi ERW Dan Air Mineral.

Tabel 5.3 Rerata - rata jumlah osteoblas pada Tikus Wistar dengan periodontitis kronis dengan konsumsi ERW dan air mineral

Kelompok	Jumlah osteoblas	Standar Deviasi	Nilai uji Kolmogorof smirnov	Nilai levene test	Nilai P oneway ANOVA
Air kemasan 7 Hari	8,20	0,789	0,587	0,147	0,000
ERW 7 hari	17,00	0,943	0,531		
Air kemasan 14 Hari	11,00	1,054	0,673		
ERW 14 hari	21,50	1,434	0,631		



Gambar 5.3 Grafik jumlah osteoblas pada tikus Wistar dengan periodontitis kronis dengan konsumsi ERW dan air mineral

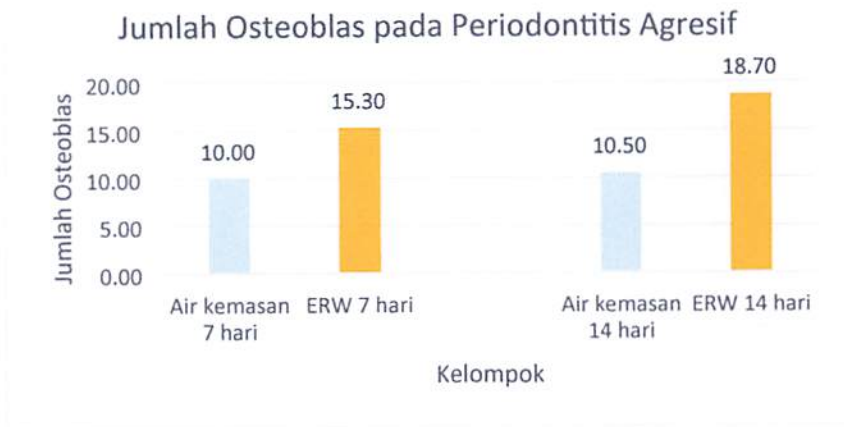
Nilai uji komogorof smirnov menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ($P < 0,05$) dan nilai levene test menunjukkan bahwa data homogen ($P > 0,05$) sehingga dapat dilanjutkan dengan uji beda oneway ANOVA

Hasil uji one way ANOVA menunjukkan nilai $P < 0,05$ sehingga disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan pada semua kelompok. Kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc tukey HSD untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok. Terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antara kelompok Air kemasan 7 hari dengan kelompok ERW 7 hari dan Air kemasan 14 hari; kelompok Air kemasan 14 hari dengan kelompok ERW 14 hari; dan kelompok Air kemasan 7 hari dengan ERW 14 hari.

5.4 Jumlah Osteoblas pada tikus Wistar dengan Periodontitis Agresif dengan Konsumsi ERW dan Air Mineral.

Tabel 5.4 Rerata jumlah osteoblas pada Tikus Wistar dengan periodontitis agresif dengan konsumsi ERW dan air mineral

Kelompok	Jumlah osteoblas	Standar Deviasi	Nilai uji Kolmogorof smirnov	Nilai levene test	Nilai P oneway ANOVA
Air kemasan 7 Hari	10,00	1,155	0,329	0,178	0,000
ERW 7 hari	15,30	1,059	0,582		
Air kemasan 14 Hari	10,50	0,850	0,709		
ERW 14 hari	18,70	1,567	0,927		



Gambar 5.4 Grafik jumlah osteoblas pada tikus Wistar dengan periodontitis agresif dengan konsumsi ERW dan air mineral.

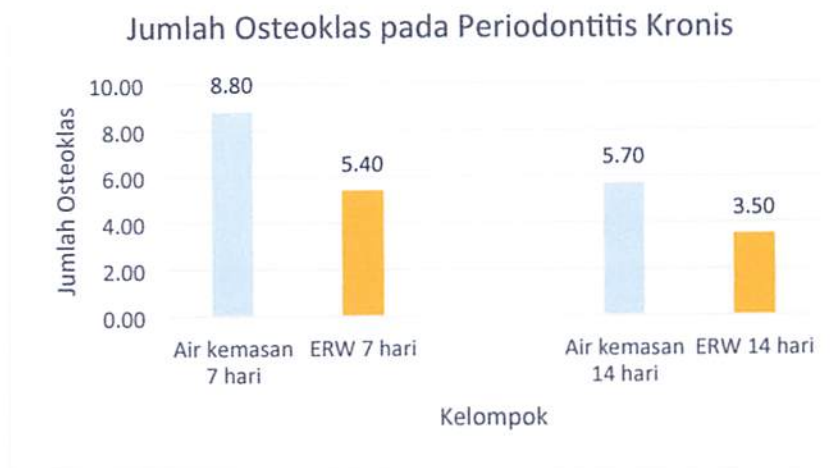
Nilai uji komogorof smirnov menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ($P < 0,05$) dan nilai levene test menunjukkan bahwa data homogen ($P > 0,05$) sehingga dapat dilanjutkan dengan uji beda oneway ANOVA

Hasil uji one way ANOVA menunjukkan nilai $P < 0,05$ sehingga disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan pada semua kelompok. Kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc tukey HSD untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok. Terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antara kelompok Air kemasan 7 hari dengan kelompok ERW 7 hari; kelompok Air kemasan 14 hari dengan kelompok ERW 14 hari; dan kelompok Air kemasan 7 hari dengan ERW 14 hari.

5.5 Jumlah Osteoklas pada Tikus Wistar dengan Periodontitis Kronis dengan Konsumsi ERW dan Air Mineral.

Tabel 5.5 Rerata jumlah osteoklas pada Tikus Wistar dengan periodontitis kronis dengan konsumsi ERW dan air mineral

Kelompok	Jumlah osteoklas	Standar Deviasi	Nilai uji Kolmogorof smirnov	Nilai levene test	Nilai P oneway ANOVA
Air kemasan 7 Hari	8,40	0,789	0,587	0,238	0,000
ERW 7 hari	5,40	0,516	0,110		
Air kemasan 14 Hari	5,70	0,823	0,320		
ERW 14 hari	3,50	0,527	0,230		



Gambar 5.5 Grafik jumlah osteoklas pada tikus Wistar dengan periodontitis kronis dengan konsumsi ERW dan air mineral

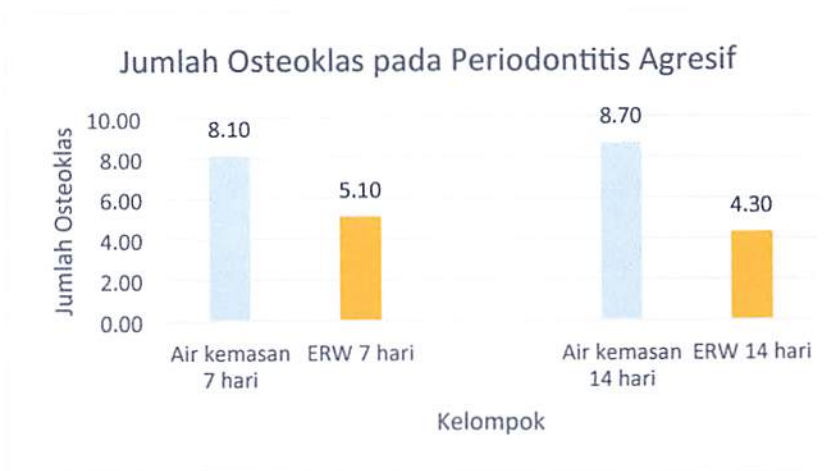
Nilai uji komogorof smirnov menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ($P < 0,05$) dan nilai levene test menunjukkan bahwa data homogen ($P > 0,05$) sehingga dapat dilanjutkan dengan uji beda oneway ANOVA

Hasil uji one way ANOVA menunjukkan nilai $P < 0,05$ sehingga disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan pada semua kelompok. Kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc tukey HSD untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok. Terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antara kelompok Air kemasan 7 hari dengan kelompok ERW 7 hari dan ERW 14 hari; kelompok Air kemasan 14 hari dengan kelompok ERW 14 hari; dan kelompok Air kemasan 7 hari dengan ERW 14 hari.

5.6 Jumlah Osteoklas pada Tikus Wistar dengan Periodontitis Agresif dengan Konsumsi ERW dan Air Mineral.

Tabel 5.6 Rerata jumlah osteoklas pada Tikus Wistar dengan periodontitis agresif dengan konsumsi ERW dan air mineral

Kelompok	Jumlah osteoklas	Standar Deviasi	Nilai uji Kolmogorof smirnov	Nilai levene test	Nilai P oneway ANOVA
Air kemasan 7 Hari	8,10	1,197	0,923	0,726	0,000
ERW 7 hari	5,10	0,876	0,570		
Air kemasan 14 Hari	8,70	0,949	0,697		
ERW 14 hari	4,30	1,160	0,809		



Gambar 5.6 Grafik jumlah osteoklas pada tikus Wistar dengan periodontitis agresif dengan konsumsi ERW dan air mineral.

Nilai uji komogorof smirnov menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ($P < 0,05$) dan nilai levene test menunjukkan bahwa data homogen ($P > 0,05$) sehingga dapat dilanjutkan dengan uji beda oneway ANOVA

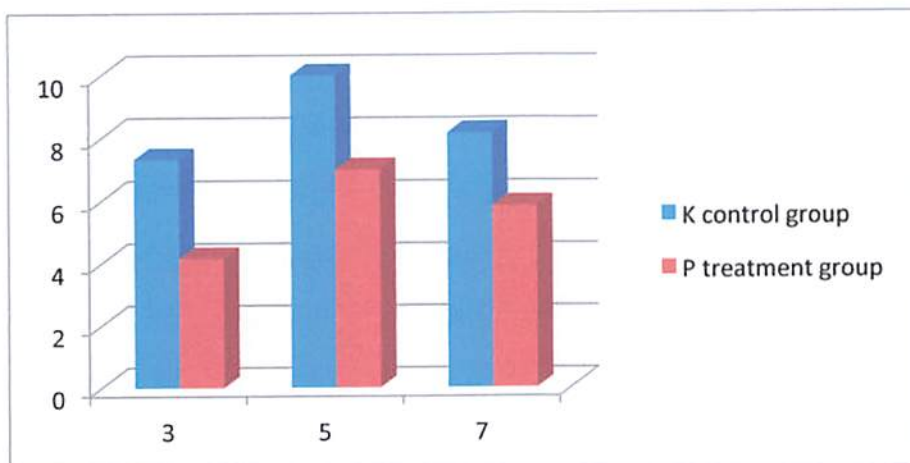
Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan nilai $P < 0,05$ sehingga disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan pada semua kelompok. Kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc tukey HSD untuk melihat perbedaan masing-masing kelompok. Terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antara kelompok Air kemasan 7 hari dengan kelompok ERW 7 hari; kelompok Air kemasan 14 hari dengan kelompok ERW 14 hari.

5.7 Hasil dan Analisis Jumlah Osteoklas pada Pergerakan Gigi Ortodonti

Tabel 5.7 Nilai rerata dan standar deviasi hasil pemeriksaan jumlah Osteoklas

Waktu (hari)	Kelompok	Rerata	SD
3	K3	7,33	1,211
	P3	4,16	0,752
5	K5	10	1,549
	P5	7	0,894
7	K7	8,16	2,316
	P7	5,83	0,752

Tabel diatas menunjukkan hasil rerata jumlah Osteoklas pada kelompok perlakuan lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Jumlah Osteoklas pada kelompok kontrol cenderung naik pada hari ke 5 (K5) dan menurun pada hari ke 7 (K7), sedangkan pada kelompok perlakuan jumlah Osteoklas juga naik pada hari ke 5 (P5) dan menurun pada hari ke 7 (P7). Nilai rerata tertinggi jumlah Osteoklas pada kelompok kontrol terlihat pada hari ke (10 ± 1,549) dan rerata terendah terlihat pada hari ke 3 (7,33 ± 1,211). Sedangkan pada kelompok perlakuan, rerata tertinggi terlihat pada hari ke 5 (7 ± 0,894) dan rerata terendah terlihat pada hari ke 3 (4,16 ± 0,752). Distribusi nilai rerata jumlah Osteoklas juga dapat dilihat pada gambar 5.7.



Gambar 5.7 Grafik rerata jumlah Osteoklas pada sel jaringan tulang alveolar masing-masing kelompok

Tabel 5.8 Uji normalitas jumlah Osteoklas

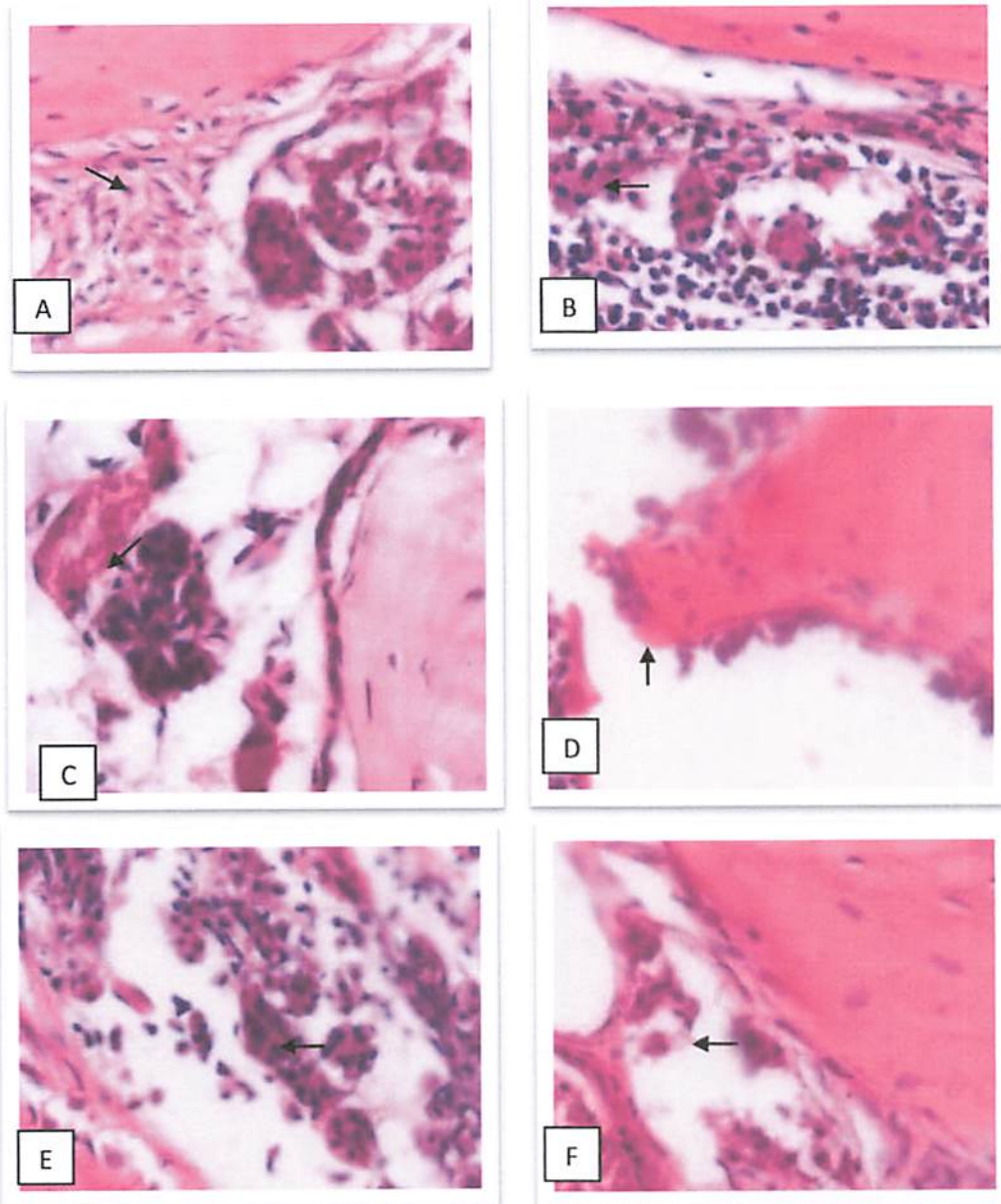
Waktu (Hari)	Kelompok	Normalitas
3	K3	0,197
	P3	0,154
5	K5	0,642
	P5	0,999
7	K7	0,800
	P7	0,056

Berdasarkan data yang diperoleh dilajukan uji beda dengan menggunakan *Oneway ANOVA*, dan didapatkan nilai Sig. jumlah Osteoklas sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang artinya terdapat perbedaan bermakna antar kelompok.

Tabel 5.9 Uji *T-test* jumlah osteoklas

Waktu (Hari)	Kelompok	Sig.
3	K3 P3	0,000*
5	K5 P5	0,002*
7	K7 P7	0,040*

Pemeriksaan jumlah Osteoklas dilakukan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pemeriksaan dilakukan dengan teknik histopatologi untuk mengetahui jumlah sel yang mengekspresikan Osteoklas. Tampak jumlah Osteoklas terdistribusi pada sel osteoklas tulang alveolar pada kelompok penelitian seperti terlihat pada gambar 5.8 berikut ini.

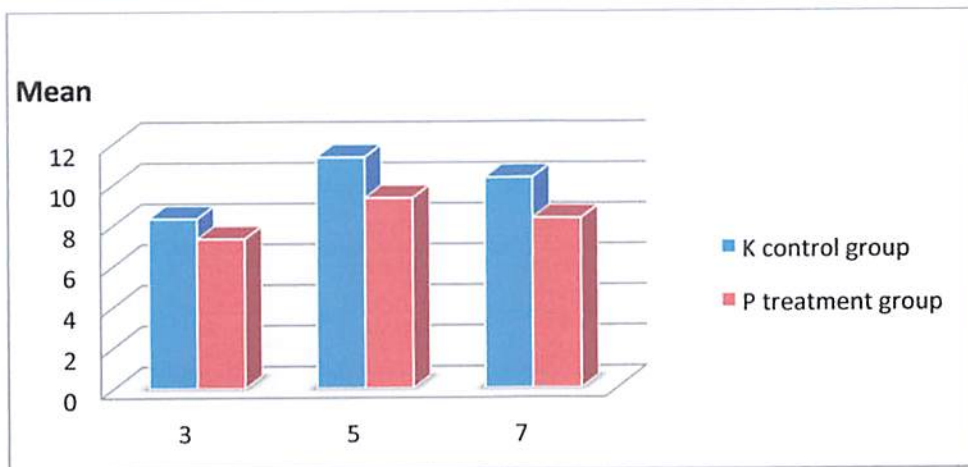


Gambar 5.8 Pewarnaan HE pada kelompok kontrol (K) dan perlakuan (P) : A. K3, B. P3, C. K5, D. P5, E. K7, F. P7

5.8 Hasil dan Analisis Ekspresi RANKL pada Gigi Ortodonti

Tabel 5.10. Nilai rerata dan standar deviasi (SD) ekspresi RANKL pada kelompok kontrol (K) dan kelompok perlakuan (P)

Waktu (hari)	Kelompok	Rerata	SD
3	K3	8,33	0,816
	P3	7,33	0,816
5	K5	11,33	1,032
	P5	9,33	1,751
7	K7	10,33	0,816
	P7	8,33	0,752



Gambar 5.9 Grafik Rerata ekspresi RANKL pada sel osteoklas jaringan tulang alveolar masing-masing kelompok

Pada tabel 4 dan gambar 3 menunjukkan hasil rerata ekspresi RANKL pada kelompok perlakuan lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Ekspresi RANKL pada kelompok kontrol cenderung meningkat pada hari ke 3 (K3) dan 5 (K5) yang kemudian menurun pada hari ke 7 (K7), sedangkan pada kelompok perlakuan ekspresi RANKL cenderung lebih turun dibandingkan kelompok kontrol. Nilai rerata tertinggi pada ekspresi RANKL pada kelompok kontrol terlihat pada hari ke 5 ($11,33 \pm 1,032$), dan rerata terendah terlihat pada hari ke 3 ($8,33 \pm 0,816$). Sedangkan untuk kelompok perlakuan rerata tertinggi terlihat pada hari ke 5 ($9,33 \pm 1,751$), dan rerata terendah terlihat pada hari ke 3 ($7,33 \pm 0,816$).

Hasil uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk W* menunjukkan semua data berdistribusi normal ($p > 0,05$) seperti terlihat pada tabel 5.11.

Tabel 5.11 Nilai Uji Normalitas ekspresi RANKL

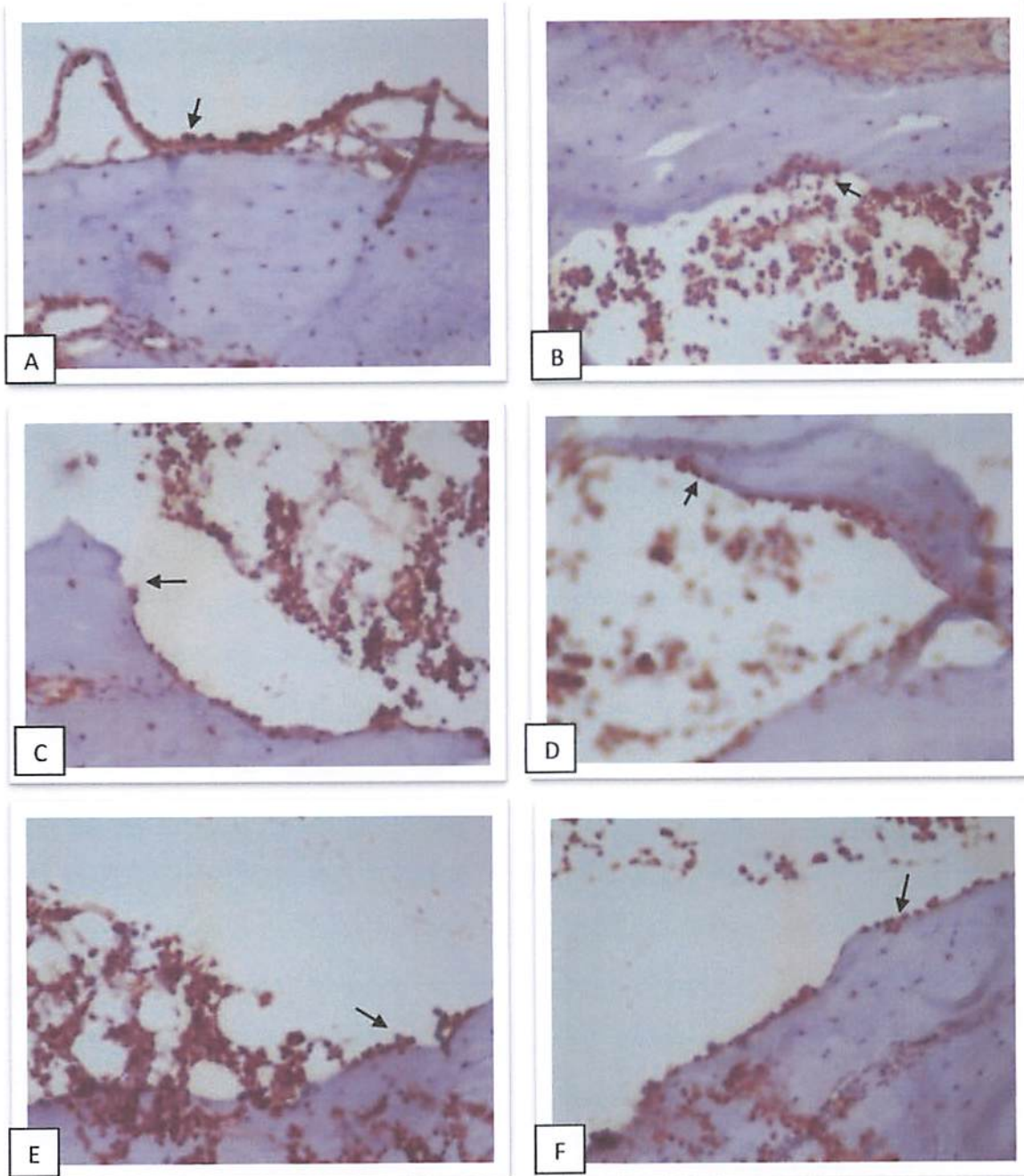
Waktu (Hari)	Kelompok	Normalitas
3	K3	0,200
	P3	0,200
5	K5	0,915
	P5	0,882
7	K7	0,200
	P7	0,056

Berdasarkan data yang diperoleh dilajukan uji beda dengan menggunakan *Oneway ANOVA*, dan didapatkan nilai Sig. Ekspresi RANKL sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang artinya terdapat perbedaan bermakna antar kelompok. Untuk mengetahui secara detail kelompok mana yang berbeda bermakna dilakukan uji *T-test* yang dapat dilihat pada tabel 6 berikut.

Tabel 5.12 Perbedaan bermakna ekspresi RANKL antara kelompok penelitian pada hari ke 5 dan 7

Waktu (Hari)	Kelompok	Sig.
3	K3 P3	0,0599
5	K5 P5	0,0367*
7	K7 P7	0,0079*

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan ekspresi RANKL pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pemeriksaan dilakukan dengan teknik imunohistokimia, untuk mengetahui jumlah sel yang mengekspresikan RANKL. Tampak ekspresi RANKL terdistribusi pada sel osteoklas tulang alveolar pada kelompok penelitian seperti terlihat pada gambar 5.10



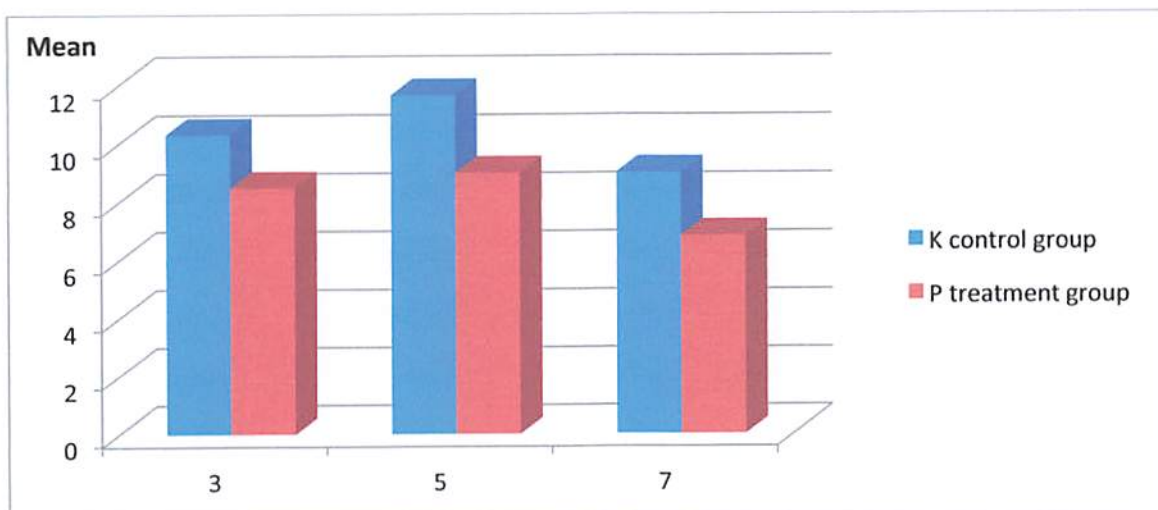
Gambar 5.10. Pewarnaan IHC pada kelompok kontrol dan perlakuan (P) A. K3, B. P3, C. K5, D. P5, E. K7, F. P7

5.9 Hasil dan Analisis Ekspresi OPG pada Gigi Ortodonti

Tabel 5.13 Nilai rerata dan standar deviasi hasil pemeriksaan jumlah ekspresi OPG

Waktu (hari)	Kelompok	Rerata	SD
3	K3	10,33	1,032
	P3	8,5	1,048
5	K5	11,66	1,366
	P5	9	1,414
7	K7	9	0,894
	P7	6,83	1,169

Tabel diatas menunjukkan hasil rerata ekspresi OPG pada kelompok perlakuan lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Ekspresi OPG pada kelompok kontrol meningkat pada hari ke 5 (K5) dan menurun pada hari ke 7 (K7), sedangkan pada kelompok perlakuan ekspresi OPG juga meningkat pada hari ke 5 (P5) dan menurun pada hari ke 7 (P7). Nilai rerata tertinggi ekspresi OPG pada kelompok kontrol terlihat pada hari ke 5 ($11,6 \pm 1,366$), dan rerata terendah terlihat pada hari ke 7 ($9 \pm 0,894$). Sedangkan pada kelompok perlakuan, rerata tertinggi terlihat pada hari ke 5 ($9 \pm 1,414$) dan rerata terendah terlihat pada hari ke 7 ($6,83 \pm 1,169$). Distribusi nilai rerata ekspresi OPG juga dapat dilihat pada gambar 5.11 berikut ini.



Gambar 5. 11 Grafik rerata ekspresi OPG pada sel osteoblas jaringan tulang alveolar masing-masing kelompok

Hasil uji normalitas menggunakan Shapiro-Wilk menunjukkan semua data berdistribusi normal ($p > 0,05$) seperti terlihat pada tabel 5.14

Tabel 5.14 Nilai Uji Normalitas ekspresi OPG

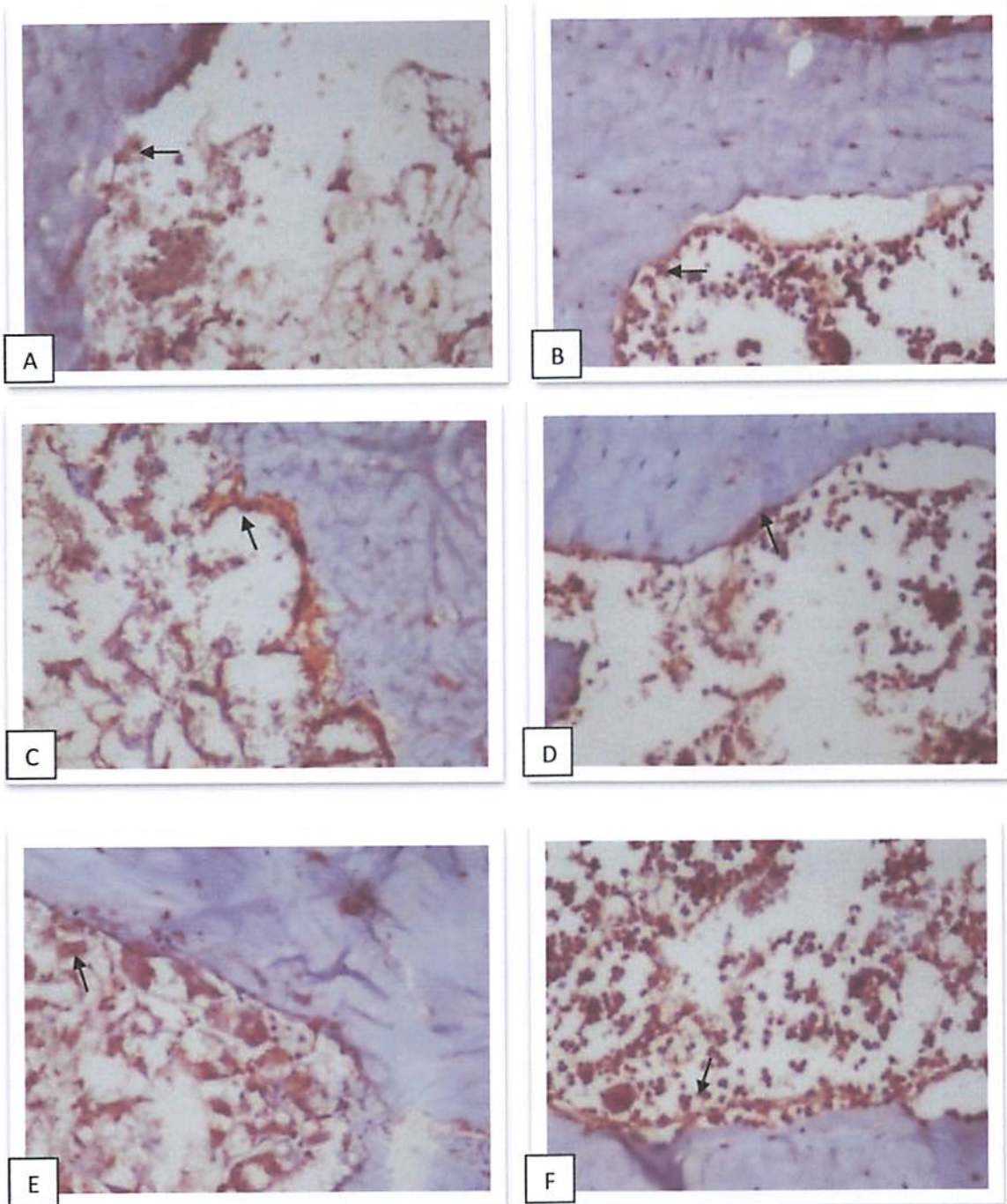
Waktu (Hari)	Kelompok	Normalitas
3	K3	0,915
	P3	0,996
5	K5	0,847
	P5	0,999
7	K7	0,999
	P7	0,594

Berdasarkan data yang diperoleh dilajukan uji beda dengan menggunakan *Oneway ANOVA*, dan didapatkan nilai Sig. Ekspresi OPG sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang artinya terdapat perbedaan bermakna antar kelompok. Untuk mengetahui secara detail kelompok mana yang berbeda bermakna dilakukan uji *T-test* yang dapat dilihat pada tabel 5.15 berikut.

Tabel 5.15 Perbedaan ekspresi OPG antara kelompok penelitian pada hari ke 3, 5, dan 7

Waktu (Hari)	Kelompok	Sig.
3	K13 K23	0,007*
5	K15 K25	0,012*
7	K17 K27	0,004*

Pemeriksaan Ekspresi OPG dilakukan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pemeriksaan dilakukan dengan teknik imunohistokimia, untuk mengetahui jumlah sel yang mengekspresikan OPG. Tampak ekspresi OPG terdistribusi pada sel osteoblas tulang alveolar pada kelompok penelitian seperti terlihat pada gambar 5.12 berikut ini.



Gambar 5.12 Pewarnaan IHC kelompok kontrol (K) dan perlakuan (P) A. K3, B. P3, C. K5, D. P5, E. K7, F. P7

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

1. Menyelesaikan laporan penggunaan anggaran.
2. Menyelesaikan laporan tanggungjawab keuangan.
3. Meneruskan penelitian dengan beberapa parameter dan *biomarker* yang menunjukkan adanya pengaruh ERW pada inflamasi, khusus nya periodontitis, sehingga didapatkan mekanisme yang jelas kemampuan ERW pada periodontitis.
4. Penentuan ERW sebagai salah satu alternatif tindakan preventif pada periodontitis.



BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Pemberian ERW pada tikus Wistar dengan periodontitis kronis selama 7 dan 14 hari menurunkan kadar MDA dan jumlah osteoklas.
2. Pemberian ERW pada tikus Wistar dengan periodontitis kronis selama 7 dan 14 hari meningkatkan jumlah osteoblast.
3. Pemberian ERW pada tikus Wistar dengan periodontitis agresif selama 7 dan 14 hari menurunkan kadar MDA dan jumlah osteoklas
4. Pemberian ERW pada tikus Wistar dengan periodontitis agresif selama 7 dan 14 hari meningkatkan jumlah osteoblas
5. Peningkatan ekspresi RANKL dan jumlah osteoklas pada hari ke 5 pada gigi ortodonti
6. Penurunan ekspresi RANKL dan jumlah osteoklas pada hari ke 7 pada gigi ortodonti
7. Peningkatan Ekspresi OPG pada hari ke 5
8. Penurunan ekspresi OPG pada hari ke 7
9. Ratio RANKL/OPG yang rendah menggambarkan regenerasi dan perbaikan jaringan

7.2 Saran

1. Dilakukan analisis bagaimana reaksi inflamasi yang terjadi pada periodontitis agresif dan periodontitis kronis pada pemberian ERW pada tikus Wistar melalui berbagai jalur.
2. Dilakukan analisis terjadinya kerusakan jaringan periodontal dan tulang alveolar pada periodontitis agresif dan periodontitis kronis pada pemberian ERW pada tikus Wistar.
3. Dilakukan analisis terjadinya perbedaan mekanisme kerja ERW pada periodontitis agresif dan periodontitis kronis.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas Abul K, Lichtman Andrew H, Pober Jordan S, 2000. Cellular and Molecular Immunology, 4th ed. WB Saunders Company : 199, 331-333
- Alfant BL, 2009. Matrix metalloproteinase levels and microflora associated with aggressive periodontitis in children. Thesis.University of Florida, p. 1-30
- Carranza FA. Clinical diagnosis. Dalam: Carranza FA, Newman MG, (eds). Clinical periodontology. Ed ke-8. Philadelphia: WB Saunders; 2006. p. 349-50.
- Claesson R, Johansson A, Belibasakis G, Hånström, Kalfas S, 2002. Release and activation of matrix metalloproteinase 8 from human neutrophils triggered by the leukotoxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Blackwell Munksgaard Ltd.
- Feng Z and Weinberg A, 2006. Role of Bacteria in Health and Diseases of Periodontal Tissues. Periodontology 2000. 40:50-76
- Henderson B, Ward JM, Ready D, 2010. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* : a triple A* periodontopathogen? Periodontology 2000.54:78-105
- Hofmann, U. B., Westphal, J. R., Van Muijen, G. N., and Ruiters, D. J. Matrix metalloproteinases in human melanoma. J Invest Dermatol, 115: 337-344, 2000
- Ingman T, Apajalahti S, Mäntylä P, Savolainen P, Sorsa T, 2005. Matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation. European Journal of Orthodontics. 27; 202-207
- Kline KA, Falker S, Dahlberg S, Normark S and Henriques-Normark B, 2009. Bacterial adhesin in host-microbe interaction. Cell Host and Microbe Elsevier Inc. 5:580-592
- Korman KS, 2000. Genetics factors in the pathogenesis of periodontitis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Periodontol 20:135-167.
- Lamont RJ and Yilmaz Ö, 2002. In or out: the invasiveness of oral bacteria.Periodontology 2000 30: 61-69
- Lamont RJ, Burne RA, Lantz MS, Leblanc DJ, 2006. Periodontal diseases in oral microbiology and immunology. ASM Press American Society for Microbiology.Washington DC 253-259.



- Newman MG, Takei N, Klokkevold P, Carranza F, 2012. Carranza's Clinical Periodontology. 11th ed. Missouri. Elsevier. WB Saunders Co. Philadelphia, New York, London, p: 43, 168- 181, 409-414, 675-688
- Nisengard RJ, Haake SK, Newman MG and Miyasaki KT, 2009. Microbial Interaction with the Host in Periodontal Disease. p 110-119.
- Noyan U, Yilma S, Kuru B. A clinical and microbiological evaluation of sistemic and local metronidazole delivery in adult periodontitis patients. J Clin Periodontol 1997; 24: 158-65.
- Ouhara K, Komatsuzawa H, Shiba H, Uchida Y, Kawai T, Sayama K, Hashimoto K, Taubman MA, Kurihara H, Sugai M, 2006. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of β - defensin and the 18-KiloDalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells. Infection and Immunity. 74: 5211-5230
- Sander, C. S., Hamm, F., Elsner, P., and Thiele, J. J. 2003. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer . Br J Dermatol, 148: 913-922,
- Shah, A. H., T abayoyong, W. B., Kundu, S. D., Kim, S. J., Parijs, L. V., Liu, V. C., Kwon, E., Greenberg, N. M., and Lee, C. 2002. Supression of tumor metastasis by blockade of transforming growth factor signaling in bone marrow cellSilva TA, Garlet GP, Fukada SY, through a retroviral-mediated. Cancer Res, 62: 7135-7138.
- Silva JS, Cunha FQ, 2007. Chemokines in oral inflamatory diseases: Apical Periodontitis and Periodontal Diseases. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. J Dent Res 86 (4): 306-319
- Sorsa T, Tjdrhanc L, Salo T, 2004. Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Oral Apoptosis in Cancer, American Journal of Pathology, 153(4):1041-1048
- Todar K. 2002. Mechanism of bacterial pathogenicity, University of Wisconsin. Madison Departement of Bacteriology. p.1-6
- Turner M, 1998. Antibodies and their Receptors in Roitt I, Brostoff J, Male D., Immunology 5th ed., Mosby International Ltd, London : 71-82
- Uehara A, Naito M, Imamura T, Potempa J, Travis J, Nakayama K, Takada H, 2008. Dual regulation of interleukin-8 production in human oral epithelial cells upon stimulation with gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. Journal of Medical Microbiology. 57: 500-507
- Velden V, Abbas F, Armand S, Loos BG, Timmerman MF, Weijden V, 2006. Java project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis : risk factor, risk predictors and risk determinants. J Clin. Periodontol. 33 : 540-49

Wizemann TM, Adamoum JE and langermann S, 1999. Adhesin as Targets for Vaccine Development. Centers for Disease Control and Prevention. USA.p.1-5.

Original Research Article

Effect of electrolyzed reduced water on malondialdehyde levels and neutrophil cells in aggressive periodontitisMarkus B Rahardjo¹, Rini D Ridwan^{1*}, Delaneira AD Hikmah²¹Department of Oral Biology, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia, ²Undergraduate Student, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia*For correspondence: Email: rini-d-r@fkg.unair.ac.id; Tel: (+62 31) 5030255, 5020256

Sent for review: 25 October 2017

Revised accepted: 21 January 2018

Abstract**Purpose:** To evaluate the effects of electrolyzed reduced water (ERW) on malondialdehyde (MDA) levels and neutrophil cells in Wistar rats suffering from aggressive periodontitis.**Methods:** Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were infected with *A. actinomycetemcomitans* before being divided into a control group and a treatment group. The control group was treated orally with distilled water (pH 7.0), while the treatment group was administered with ERW (pH 9.8, 20 ml/day) for three successive days. Gingival tissue taken post-treatment was examined to determine the number of neutrophils and MDA level. Hematoxylin eosin staining was performed to identify neutrophil cells while MDA levels were determined by colorimetric assay.**Results:** The number of neutrophils in the control group (30.04 ± 15.30) was higher than that of the treatment group (7.76 ± 2.52), while the MDA levels of the control and treatment groups were 4.58 ± 0.66 and 4.30 ± 0.81 , respectively ($p < 0.05$).**Conclusion:** ERW demonstrates the ability to reduce neutrophil cells without altering MDA levels in Wistar rats suffering from aggressive periodontitis. This is an indication that ERW was an effective material to manage aggressive periodontitis.**Keywords:** Periodontitis, Electrolyzed reduced water, Malondialdehyde, Neutrophil cells

This is an Open Access article that uses a funding model which does not charge readers or their institutions for access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) and the Budapest Open Access Initiative (<http://www.budapestopenaccessinitiative.org/read>), which permit unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited.

Tropical Journal of Pharmaceutical Research is indexed by Science Citation Index (SciSearch), Scopus, International Pharmaceutical Abstract, Chemical Abstracts, Embase, Index Copernicus, EBSCO, African Index Medicus, JournalSeek, Journal Citation Reports/Science Edition, Directory of Open Access Journals (DOAJ), African Journal Online, Bioline International, Open-J-Gate and Pharmacy Abstracts

INTRODUCTION

Periodontitis is an inflammatory disease resulting in the destruction of tissues and structures surrounding the teeth and represents a major worldwide oral disease [1]. Data issued by the Health Research and Development Department of the Indonesian Ministry of Health (Rikesdas) in 2014 confirmed that the prevalence of periodontitis within the country remained high [2],

constituting the second most prevalent oral disease after caries [3].

Aggressive periodontitis is a destructive inflammatory disease characterized by periodontal attachment loss and bone resorption [4]. Patients with this condition often demonstrate an inadequate immune response to pathogenic organisms. Periodontal pathogens will induce a significantly elevated production of inflammatory mediators [5]. Aggressive periodontitis is

predominantly caused by the gram-negative bacteria, *A. actinomycetemcomitans* one virulent factor of which is leukotoxin, an inflammatory mediator activating inflammatory cells, such as leukocytes, polymorphonuclear (PMN), and macrophages [6,7].

The superoxide of reactive oxygen species (ROS) is produced by inflammatory cells as a defense mechanism response to infection. An increased level of ROS can be destructive to the body since it has the same properties as interleukin which damages tissue if produced in excessive amount. High levels of ROS can lead to lipid peroxidation a secondary product of which is malondialdehyde (MDA), a biomarker of ROS activities [8,9]. Excessive ROS must be eliminated in order to avoid tissue damage. It can be reduced by a component such as active hydrogen which is able to bind to the free electrons of ROS. In addition, active hydrogen atoms can inhibit the expressions of proinflammatory cytokine [10].

Electrolyzed reduced water (ERW) is also known as alkaline electrolyzed water, alkali-ionic water, alkaline cathodic water and alkaline ionized water. ERW can be defined as water with an alkaline pH which contains hydrogen-rich molecules [11]. Active hydrogen atoms can be obtained from ERW at the cathode by means of an electrolysis process.

ERW contains low levels of dissolved oxygen and high levels of dissolved hydrogen, while demonstrating a negative redox potential. ERW at a pH of 9.8 has been reported to reduce levels of ROS in the blood plasma of patients with kidney disorders [12]. Previous studies have also confirmed active hydrogen atoms as demonstrating the ability to decrease the activities of ROS [11,12].

ERW is produced through a process of electrolysis or ionization. The result of water electrolysis is either acid or base form. Acidic water, while unsuitable for human consumption is appropriate for the treatment of the human body and maintaining levels of hygiene. Meanwhile, ERW or alkaline water has certain health benefits when consumed [13]. The aim of this study is to evaluate the effects of ERW on MDA levels and neutrophil cells in Wistar rats suffering from aggressive periodontitis.

EXPERIMENTAL

Animals

This study consisted of laboratory-based experi-

mental research involving the use of rats (*Rattus norvegicus*) as animal subjects. The inclusion criteria included the following; male, aged 2-5 months, in healthy condition and weighing between 150 and 250 g. Research subjects were given seven days to acclimatize. Ethical permission for the study was obtained in accordance with the guidelines of the Board for Animal Experiments at the Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga (no. 176/KKEPK.FKG/VIII/2016) which followed the Guidelines on the Care and Use of Animals for Scientific Purposes [14].

Induction of aggressive periodontitis

The research subjects were divided into two groups: control and treatment (n = 7), both of which were induced with *A. actinomycetemcomitans* bacteria 0.5 mL at a dose of 10^8 CFU/mL once a day for five days or until their mandibular right and left first molar regions were inflamed.

Experimental design

The animals in the control group were treated orally with distilled water of neutral pH (pH 7.0) at a dose of 20 mL per day (5 mL x 4) for three days. In contrast, those constituting the treatment group were orally treated with ERW with a pH of 9.8 at a dose of 20 mL per day (5 mL x 4) over the same period.

Histological staining

After three days of ERW supplementation, the experiment animals were sacrificed by injecting a 50 mg/kg dose of ketamine (Combipar, Jakarta, Indonesia). The gingival tissues were extracted and fixed with buffered formalin solution (P4417, Sigma, Indonesia) for 24 hours before being dehydrated and cleared with alcohol. Samples were then embedded in paraffin prior to HE staining. Neutrophil cell identification was performed by means of a light microscope at 1000x magnification.

Determination of MDA levels

300 mg of gingival tissues were pulverized and homogenized using 1 mL of cold phosphate buffer, (P4417, Sigma, Indonesia) and 10 μ L of probucol solution. Samples of 200 μ L were placed in assay tubes, and R1 reagents of MDA kit (MDA-586 Bloxytech, OXIS Health Products, Portland, USA) were added. The samples were vortexed and 150 μ L of R2 reagents were added to each tube. All control and treatment group assay tubes were incubated at a temperature of

45 °C for 60 minutes. The samples were subsequently centrifuged (DSC-200A Dslab, Taiwan) at 6,000 rpm for ten minutes. The supernatants were removed and the absorbance values were read using a spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Japan) at a wavelength of 586 nm.

Statistical analysis

All the data obtained are presented as mean \pm standard deviation (SD) and were analyzed using independent *t*-test using SPSS 21. Differences were considered significant if $p < 0.05$.

RESULTS

The levels of MDA and neutrophil are shown in Table 1. There was no significant difference in MDA levels ($p = 0.489$) between control and treatment groups. The numbers of neutrophils in the control and treatment groups were significantly different ($p = 0.003$). The HE staining results for the control and treatment group neutrophils are shown in Figure 1.

Table 1: Mean MDA levels and neutrophils in the rats

Group	MDA levels (mean \pm SD)	Neutrophil (mean \pm SD)
Control	4.58 \pm 0.66	30.04 \pm 15.30
Treatment	4.30 \pm 0.81	7.76 \pm 2.52*

*Significant different ($p < 0.05$)

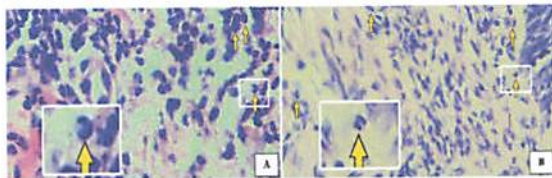


Figure 1: Neutrophil expression (yellow arrow) after HE staining using light microscope 1000x in treatment (A) and control (B) group

DISCUSSION

Aggressive periodontitis is a periodontal disease which demonstrates a high level of *A. actinomycetemcomitans*. The host response to bacterial infection plays a critical role in periodontal pathogenesis. PMN is a first-line host defense, against the bacteria which utilizes oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms. The oxygen-dependent pathway involves the production of ROS [15], the excessive presence of which may induce periodontal tissue destruction [15,16].

This study used ERW as an alternative therapy for aggressive periodontal disease and was

conducted to evaluate its effectiveness in this regard. The subjects were divided into two groups, control and treatment. The control group, serving as a reference standard for comparing MDA and neutrophil levels with those of the treatment group, was treated with distilled water of neutral pH. Distilled water is a clear, colorless, odorless, non-toxic liquid with a molecular weight of 18.0 g/mol and pH of 5 - 7. The treatment group was treated using ERW with a pH of 9.8. Previous studies have shown pH 9.8 to be capable of reducing ROS and inflammation in kidney disease [17].

The average level of MDA in the treatment group was lower than that of the control group. However, the results of the analysis confirmed there was no significant difference in the level of MDA between the two groups. This was possibly due to a decrease in the antioxidant activities of ERW. ERW is affected by heat and cannot be consumed immediately since this would lead to the instability of active hydrogen atoms and a decrease in antioxidant activities [18]. Furthermore, the antioxidant capabilities of ERW did not reach their maximum level due to the comparatively short treatment period (three days). Previous results indicated that ERW can reduce the inflammatory process in atopic dermatitis when consumed for 25 days [19]. Furthermore, ERW can decrease ROS activities in blood plasma after being consumed for one month [17].

The level of neutrophil in the treatment group was significantly lower than that of control group. This is related to the anti-inflammatory activities of ERW [17]. For example, ERW with a pH of 9.8 promotes anti-inflammatory activities by lowering the levels of cytokines in mice suffering from atopic dermatitis triggered by *Dermatophagoides farinae*. Active hydrogen atoms can also reduce pro-inflammatory expressions, including: tumor necrotizing factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1, IL-10, IL-12, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), high-mobility group protein 1 (HMGB-1), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), and prostaglandin E2 (PGE2). ERW also inhibits cyclooxygenase (Cox-2) expressions by decreasing IL-1 and TNF- α . The inhibition of IL-1 and TNF- α synthesis leads to reduced stimulation of cell membrane phospholipids. Consequently, arachidonic acid is not released from the cell membrane phospholipids by phospholipase activation. This condition leads to a reduction in both cox-2 protein synthesis and prostaglandin biosynthesis which, in turn, results in a decreased inflammatory response [20]. The

inhibition of IL-1 and TNF α synthesis also leads to capillary vasoconstriction and increased capillary permeability. According to Ohta, ERW can also inhibit the release of PGE2 resulting in a decrease in the pain threshold and inflammatory response [10].

CONCLUSION

The findings of this study indicate that ERW reduces the number of neutrophils without affecting MDA levels in Wistar rats suffering from aggressive periodontitis. These results confirm that ERW was an effective material to manage aggressive periodontitis.

DECLARATIONS

Acknowledgement

The Indonesian Ministry of Research, Technology, and Higher Education for a grant for this research in 2015, including the publication of this manuscript.

Conflict of interest

No conflict of interest is associated with this study.

Contribution of authors

The authors declare that this work was undertaken by the author(s) named in this article and all liabilities pertaining to claims relating to its contents will be borne by the authors. All the authors made substantial contributions to this study and/or manuscript, approved the final draft of the paper prior to its submission.

REFERENCES

1. Showale AH, Gattani DR, Bhatia N, Mahajan R, Saravanan SP. Prevalence of periodontal disease in the general population of India-a : systematic review. *J Clin Diagnostic Res* 2016; 10: 4–9. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4963791/>
2. Health Research and Development Department of Indonesian Health Ministry. *Basic Health Research*. 2014: 99-102.
3. Melok AW. The difference matrix metalloproteinase-8 level after scaling and after tetracycline application on periodontitis patient. *J PDGI* 2009; 58: 1–6.
4. Alabandar JM, Tinoco EM. Global epidemiology of periodontal disease in children and young persons. *Periodontol* 2000 2002; 29: 153–176.
5. Natalina, Masulili SLC, Harsas NA, Subekti I, Auerkari EI. Gingival crevicular fluid levels of resistin and adiponectin in chronic periodontitis with type 2 diabetes mellitus. *J Int Dent Med Res* 2016; 9: 329–333.
6. Marcuschamer E, Hawley CE, Speckman I, Romero RMD, Molina JN. Lifetime of normal hormonal events and their impact on periodontal health. *Perinatol Reprod Hum* 2009; 23: 53–64. Available at: http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDAR_TICULO=21864
7. Kachlany SC. Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res* 2010; 89: 561–570. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144085/>
8. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *oxidative medicine and cellular longevity*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014; 2014: 1-31. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066722/>
9. Dahiya P, Kamal R, Gupta R, Bhardwaj R, Chaudhary K, Kaur S. Reactive oxygen species in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol* 2013; 17: 411–6. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3800399/>
10. Ohta S. Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 2012; 1820: 586–594. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416511001103?via%3Dihub>
11. Shirahata S, Li Y, Hamasaki T, Gadek Z, Teruya K, Kabayama S. Redox regulation by reduced water as active hydrogen donors and intracellular ROS scavengers for prevention of type 2 diabetes. *Cell technology for cell products* (ed. Smith E). USA: Springer; 2007: 99–101.
12. Shirahata S, Hamasaki T, Teruya K. Advanced research on the health benefit of reduced water. *Trends Food Sci Technol* 2012; 23: 124–131. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224411002408>
13. Kopko, P. *Benefits of alkaline water*. USA: Alkaline People Publishing, 2008; pp 3-5.
14. Tan B. *Guidelines on the care and use of animals for scientific purposes*. National Advisory Committee for Laboratory Animal Research. 2004.
15. Guentsch A, Pukio M, Preshaw PM, Glockmann E, Pfister W, Potempa J, Eick S. Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with porphyromonas gingivalis and aggregatibacter actinomycetemcomitans. *J Periodontal Res* 2009; 44: 368–377. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4180098/>
16. D'Aluto F, Nibell L, Parker M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res* 2010; 89: 1241–1246. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3318025/>
17. Huang KC, Yang CC, Hsu SP, Lee KT, Liu HW, Morisawa S, Otsubo K, Chien CT. Electrolyzed-reduced water reduced hemodialysis-induced erythrocyte

Trop J Pharm Res, February 2018; 17(2): 236

Rahardjo et al

- impairment in end-stage renal disease patients. Kidney Int* 2006; 70: 391–398. Available at: <http://www.science-direct.com/science/article/pii/S0085253815519418?via%3Dihub>
18. Henry M, Chambron J. Physico-chemical, biological and therapeutic characteristics of electrolyzed reduced alkaline water (ERAW). *Water* 2013; 5: 94–115. Available at: <http://www.mdpi.com/2073-4441/5/4/2094>
19. Ignacio RMC, Joo KB, Lee KJ. Clinical effect and mechanism of alkaline reduced water. *Journal of Food and Drug Analysis* 2012; 20: 394–397.
20. Kao E, Hsu J, Wang C, Yang S, Lee H. Polyphenols extracted from *hibiscus sabdariffa* L. inhibited lipopolysaccharide-induced inflammation by improving antioxidative conditions and regulating cyclooxygenase-2 expression. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73: 385–390. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1271/bbb.80639>



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

RINI DEVIJANTI RIDWAN

Assoc. Prof. Ngo Thi Quynh Lan
Chairperson of LOC

Prof. Chun-Pin Lin
President of IADR-SEA



International Association for Dental Research
Southeast Asian Division



32nd IADR-SEA & 29th SEAADVIETNAM 2018

CERTIFICATE OF ACHIEVEMENT

Presents to

Rini Devijanti Ridwan (Indonesia)

In recognition of the excellent demonstration as

WINNER of

**IADR-SEA Divisional research category award in
Microbiology and Pharmacology**

The 32nd IADR-SEA Division Annual Scientific Meeting

Held on September 13th - 14th, 2018, Da Nang, Vietnam

Assoc. Prof. Ngo Thi Quynh Lan
Chairperson of LOC

Prof. Chun-Pin Lin
President of IADR-SEA

Tropical Journal of Pharmaceutical Research

ISSN: 1596-5996 (print); 1596-9827 (electronic)

Authors' Center

Logout

SmartJM
v2.1
Panel Menu

Journal Home

For Contributors

Author Guidelines
Manuscript Status
Submit Manuscript
Payment Centre
Payment Information

For Manuscripts

Aim & Scope
Ethics & Malpractice
Privacy statement
Terms of Use
Contact Us

Submitted Manuscript Information

Add revised manuscript

Title: Electrolyzed Reduced Water Effect to Osteoclast Number, RANKL and OPG Expression during Orthodontics Tooth Movements in Wistar Rat (*Rattus Novergicus*) (Invivo)

Links: [Manuscript Information](#) [Manuscript Review Comments](#) [Payment Information](#)

Attachments: [Manuscript revision instructions](#)

Manuscript Information

Authors

1. **AFP Putranto**, Jl. Mayjend Prof. Dr. Moestopo 47, Surabaya, Indonesia
2. **RI Roestamadji**, Jl. Mayjend Prof. Dr. Moestopo 47, Surabaya, Indonesia
3. **RD Ridwan**, Jl. Mayjend Prof. Dr. Moestopo 47, Surabaya, Indonesia
4. **IB Narmada**, Jl. Mayjend Prof. Dr. Moestopo 47, Surabaya, Indonesia

Abstract

Purpose: to analyze ERW effect during orthodontic tooth movement by osteoclast number, RANKL and OPG expression during orthodontic tooth movement.

Materials and Method: analytic true experimental design with random sampling method. The samples were 36 Wistar Rats (*Rattus Novergicus*) divided into 6 groups (3control groups treated with aquadest and 3treatment groups with ERW 2.5ml/100grBB.) with 6 samples each group. Every groups treated with rubber separator with 0,0284N force in maxillary incisive tooth for 7 days. Samples were euthanized and sacrificed on Day 3,5,7. Maxilla bone was taken for Immunohistochemistry examination. *Shapiro-Wilk* ($p>0.05$) continued by Analysis of Variance (ANOVA) and independent t-test ($p<0.05$) was performed to analyze the Data.

Results: ERW decreased osteoclast number in treatment group on Day 3 with Mean±Standart Deviation (SD) (4.16±0.752) and OPG expression on Day 7 (6.83±1.1.69) with significant difference between groups ($p<0.05$), while RANKL expression decreased on Day 7 (8.33±0,752) with significant different between treatment groups Day 5 and 7 ($p<0.05$).

Conclusion: ERW significantly decreased the number osteoclast on Day 3 while RANKL and OPG expression on Day 7 during orthodontic tooth movement.

Keywords: Electrolyzed Reduced Water, Receptor activator of nuclear factor kappa-? ligand, Orthodontic Tooth Movement, Osteoclast, Osteoprotegrin.

Corresponding author's email: jda-b-n@fkg.unair.ac.id

Comments for Editor:

"This manuscript submitted has not been previously published, nor is it before another journal for consideration"

Suggested Reviewers

1. **Dr A Ali**, Faculty of Dental Medicine, Gadjah Mada University, Jogjakarta, Indonesia
Tel: +62 274 547130, Email: anantoali@ugm.ac.id.
Specialty: Orthodontic

Article Ref: 20159567

Overall position: **Under review** (see below)

Submission date: 25-06-2018

Filename	Submission date	Status	Status date	
Ist submission 1. Manuscript with title page 2. Manuscript without authors 3. Copyright form	25-06-2018	Revision Required	17-07-2018	Comments

Add revised manuscript

SmartJM is a journal management software developed by McGillard Publishing

For software request and information, please contact our Software Engineer

Bukti Submit pada Trop. J. Pharm.Res.

Status of manuscript submitted to Trop J Pharm Res

Inbox x



Trop J Pharm Res <editor@atreview.org> Wed, Oct 17, 5:57 AM

to me

Dear Dr Ridwan,

The status of the manuscript with your name as an author that was submitted to Trop J Pharm Res by Dr AFP Putranto (Email: anandafirman.ortho@gmail.com Tel: +6231 5030255) has been updated. The details of the manuscript are as follows:

Manuscript Ref: 20159567

Title: Electrolyzed Reduced Water Effect to Osteoclast Number, RANKL and OPG Expression during Orthodontics Tooth Movements in Wistar Rat (*Rattus Novergicus*) (Invivo)

The Corresponding Author can check the details of the current status in the manuscript profile at https://www.tjpr.org/ojm/manuscriptview.php?Article_Ref=20159567 after you have logged in through the [manuscript control panel](#).

In the manuscript profile, click on (1) 'Manuscript review comments' to view the comments, (2) 'Reviewed manuscript' to download your manuscript with annotated review comments, and on (3) 'Manuscript review instructions' to download the instructions for reviewing the manuscript.

You are required to quote the manuscript ref number in any communication in respect of this manuscript.

Instructions on how to make payment to Trop J Pharm Res can be found at <https://www.tjpr.org/home/pages.php?cmd=Payment>. If you choose to make payment using bank transfer, western Union, or cash deposit into our account (rather than paying with your credit/debit card at <https://www.tjpr.org/checkout>), you must log your payment into our database at <https://www.tjpr.org/checkout/admin/login.php> for quick reference. This requires that you create a new account (link has been provided below the email and password fields) if you do not have the appropriate login codes. If you do not have a record of payment in our database, you will not be able to print out your letter of acceptance when the paper is fully accepted for publication

i thank you for your interest in the Trop J Pharm Res.

USEFUL LINKS

1. [Journal statements on publication ethics and practice](#)
2. [Journal statements on use, privacy and disclaimer](#)
3. [Payment Instructions](#)
4. [Make Payment Online using credit/debit card](#)
5. [Payment History](#)

Best regards

Editorial Support
Trop J Pharm Res

Electrolyzed Reduced Water Effect on Osteoclast Number, RANKL and OPG Expression during Orthodontics Tooth Movement in Mice (*Rattus Novergicus*) (Invivo)

ABSTRACT

Ananda Firman Putranto*, **Ida Bagus Narmada* Retno Indrawati****, **Rini Devijanti****

*Orthodonsia Departement

**Biologi Oral Department

Faculty of Dental Medicine Universitas Airlangga

Surabaya-Indonesia

Correspondence: Rini Devijanti Ridwan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Prof. Moestopo 48, Surabaya 60132. E-mail: rini-d-r@fkg.unair.ac.id

Purpose: To analyze Electrolyzed Reduced Water Effect (ERW) during orthodontic tooth movement by means of osteoclast number, RANKL and OPG expression.

Materials and Method: A true experimental analytic design with incorporating a random sampling method was adopted. The samples consisted of 36 Wistar Rats (*Rattus Novergicus*) divided into six groups (three control groups treated with aquadest and three treatment groups treated with ERW 2.5 ml / 100 gr body weight) with six samples contained in each group. Each group was treated with a rubber separator with 0.0284N force applied to the maxillary incisive tooth for seven days. The samples were euthanized on Days 3, 5 and 7 with the maxilla bone subsequently removed for immunohistochemistry examination. A *Shapiro - Wilk* test [$p > 0.05$] followed by an Analysis of Variance (ANOVA) and independent t - test [$p < 0.05$] were performed to analyze the data.

Results: ERW decreased the osteoclast number in the treatment group on Day 3 with Mean \pm Standard Deviation (SD) [4.16 ± 0.752] and OPG expression on Day 7 [$6.83 \pm 1.1.69$] with significant difference between groups [$p < 0.05$]. RANKL expression decreased on Day 7 [8.33 ± 0.752] with significant different between treatment groups on Day 5 and 7 [$p < 0.05$].

Conclusion: ERW significantly decreased the number of osteoclasts on Day 3, while RANKL and OPG expression decreased on Day 7 during orthodontic tooth movement.

Keywords: Electrolyzed Reduced Water (ERW), Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand, Orthodontic Tooth Movement, Osteoclast, Osteoprotegerin.

Electrolyzed Reduced Water Effect on Osteoclast Number, RANKL and OPG Expression during Orthodontic Tooth Movement in Rats (Kawar, Ardiyaningrum, 2016)

ABSTRACT

Ardiyaningrum, Rini Devi Janti, "Electrolyzed Reduced Water Effect on Osteoclast Number, RANKL and OPG Expression during Orthodontic Tooth Movement in Rats", *Journal of Dental Research*, Vol. 1, No. 1, 2016, pp. 1-5.

Keywords: Electrolyzed Reduced Water Effect, RANKL, OPG, Osteoclast Number, Orthodontic Tooth Movement.
Conclusion: ERW significantly decreased the number of osteoclasts on Day 7 while RANKL and OPG expression decreased on Day 7 during orthodontic tooth movement.
Results: ERW decreased the osteoclast number in the treatment group on Day 7 with mean ± standard deviation (SD) [4.16 ± 0.72] and OPG expression on Day 7 [0.83 ± 1.16] with significant difference between groups (p = 0.05). RANKL expression decreased on Day 7 [8.33 ± 0.72] with significant difference between treatment groups on Day 7 and 7 (p < 0.05).
[p < 0.05] were obtained to analyze the data.
ERW test [p < 0.05] followed by an analysis of Variance (ANOVA) and independent t - test - maxilla bone subsequently removed for immunohistochemical examination. A 28-day - incisor tooth for seven days. The samples were collected on Days 2 and 7 with the each group was treated with a rubber separator with 0.028N force applied to the maxillary treated with ERW 2.5 ml - 100 g body weight) with six samples contained in each group. divided into six groups (three control groups treated with equalizer and three treatment groups sampling method was adapted. The samples consisted of 10 Wistar rats (Kawar, Ardiyaningrum, 2016) and 10 electrolyzed reduced water (ERW) with incorporating a random treatment by means of osteoclast number, RANKL and OPG expression.

INTRODUCTION

Malocclusion is the third most common dental health problem after caries and periodontal disease [1]. The prevalence of malocclusion has reached 80% and continues to grow year by year increasing, in turn, the demand for orthodontic treatment in Indonesia [2]. Orthodontic Tooth Movement (OTM) occurs as a result of orthodontic mechanical strength applications occupying an area as large as $20 - 25\text{g} / \text{cm}^2$ around the tooth. [3] This represents one determinant of successful treatment. The tooth movement resulting from orthodontic treatment places the periodontal ligament under pressure and tension causing bone apposition and resorption [4]. Several attempts to accelerate the process of orthodontic treatment, including the effects of prostaglandins (PGE1 and PGE2), have been made which stimulate bone resorption by increasing the number of osteoclasts. It has also been found that the use of Low-Intensity Laser Therapy (LILT) involving the application of $4\text{ joules} / \text{cm}^2$ with a wavelength of 650 nm can decrease the expression of Heat Shock Protein-70, Matrix Metallo Proteinase - 8, and Bone Alkaline Phosphatase [5, 6, 7].

Electrolyzed Reduced Water (ERW) is one medical therapy using water from the electrolysis process which demonstrates potential as an anti-inflammatory and antioxidant [8]. In a previous study, hydrogen-rich water consumption was found capable of suppressing ligature - induced inflammation in mice [9]. The ERW anti - inflammatory effect is thought to decrease the expression of the receptor activator of nuclear factor kappa - B ligand and osteoprotegerin and the number of osteoclasts during OTM [10].

The purpose of this study was to analyze the effect of ERW on the number of osteoclasts, RANKL and OPG expression during OTM.

MATERIALS AND METHODS

The research represented a true experimental laboratory analytical study. The sample consisted of 36 healthy male Wistar rats (*Rattus Novergicus*) aged 10 - 12 weeks and weighing 200 - 250 gram. The sample was randomly divided into six groups each further sub - divided into three control groups and three treatment groups. The control group subjects were provided with mineral water, while members of the treatment group received ERW 2.5 ml / 100 gr for seven days via a pipe.

The application of a 0.0284N (Newton) power rubber separator to the maxillary left incisor for seven days was intended to induce orthodontic tooth movement in both the control and treatment groups. This represented the optimum force for promoting orthodontic tooth movement in Wistar rats (*Rattus norvegicus*). According to the method employed by Lerner et al. [11], this constitutes the conversion dose for humans to experimental subjects. Forces potentially resulting in teeth tipping in humans require the application of a 35 - 60gm mechanism [12]. At this point, the samples were sacrificed on Day 3, Day 5 and Day 7, anesthetized with ketamine and acepromazine and, finally, decapitated. The maxillary bone tissue was subsequently removed and placed in a buffered formalin solution (10 % buffer formalin solution with pH 7.0). Periodontal tissue around the left maxillary incisive was collected then immunohistochemistry using monoclonal antibody and staining technique using 3.3' - Diaminobenzidine (DAB) was performed to find out the expression of RANKL and OPG while the Hematoxylin Eosin (HE) staining used to determine osteoclast number. Immunohistochemical results (IHC) were then observed with an electron microscope (CX22 Binocular, Olympus) at 400x magnification. All data was subjected to analysis by Shapiro - Wilk ($p > 0.05$) and subsequently Analysis of Variance (ANOVA) ($p < 0.05$) using a Statistical Package for the Social Sciences 20.0 (SPSS inc, IBM Corporation, Illinois, Chicago, USA).

RESULTS

In this study, all data was distributed normally (Tables 1, 2 and 3). The osteoclast was expressed positively with HE staining in the periodontal tissue (Figure 1). The RANKL expression was positive with IHC DAB staining in periodontal tissue (Figure 2). The OPG expression was expressed positively with IHC DAB staining in the periodontal tissue (Figure 3). ERW decreased osteoclast numbers in the treatment group on Day 3 (Table 3 and Figure 4) and OPG expression on Day 7 (Table 5 and Figure 5) with significant difference between groups ($p < 0.05$), while RANKL expression decreased on Day 7 (Table 7 and Figure 6) with significant difference between treatment groups on Day 5 and 7 ($p < 0.05$) (Table 8).

Table 1. Normality test result for Osteoclast number.

Time (Day)	Group	Normality
------------	-------	-----------

3	K3	0.197
	P3	0.154
5	K5	0.642
	P5	0.999
7	K7	0.800
	P7	0.056

Table 2. Normality test result for RANKL expression.

Time (Day)	Group	Normality
3	K3	0.200
	P3	0.200
5	K5	0.915
	P5	0.882
7	K7	0.200
	P7	0.056

Table 3. Normality test result for OPG expression.

Time (Day)	Group	Normality
3	K3	0.915
	P3	0.996
5	K5	0.847
	P5	0.999
7	K7	0.999
	P7	0.594

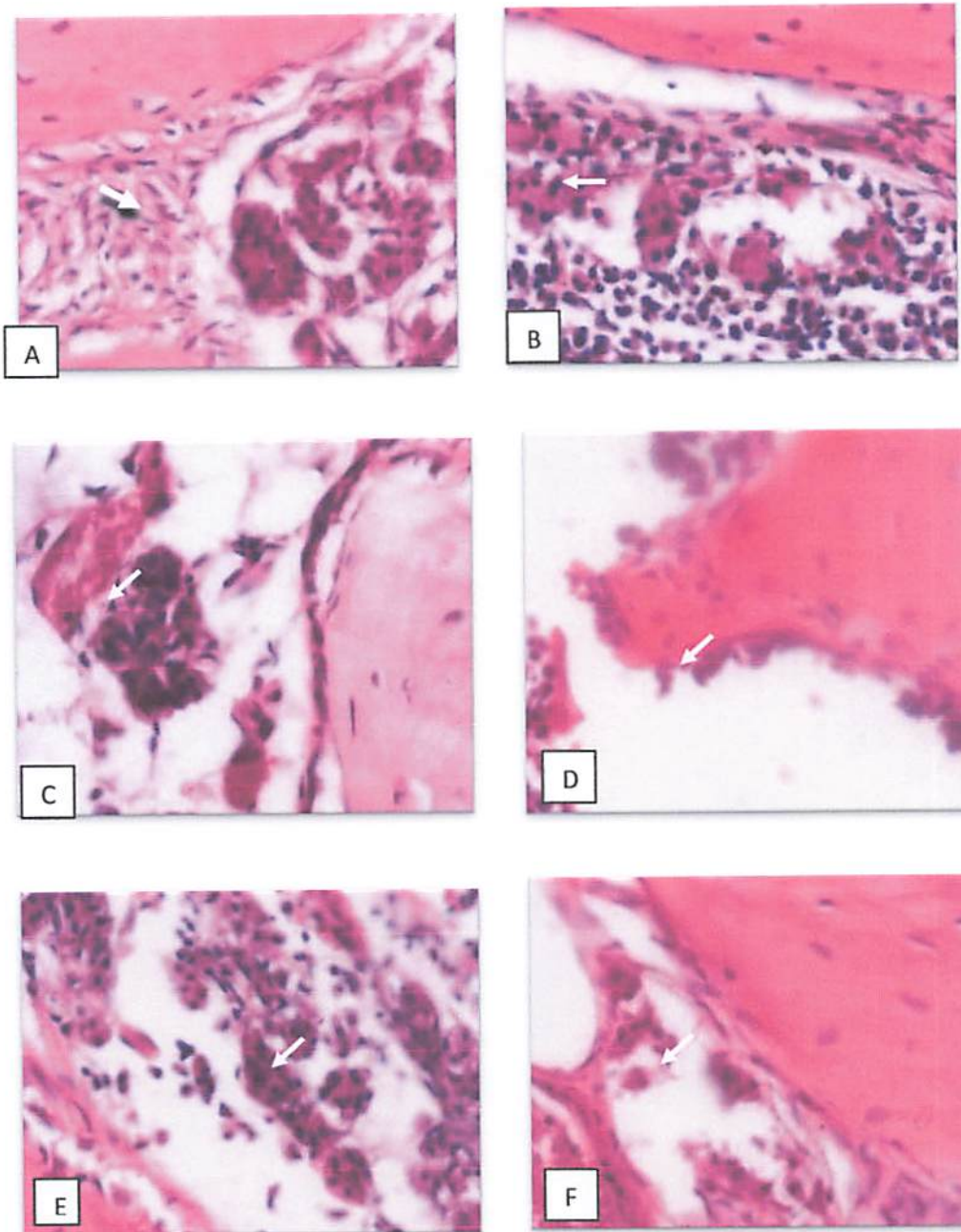


Figure 1. The number of osteoclasts in Wistar rat (*Rattus Novergicus*) periodontal tissue. A. K3, B. P3 the number of osteoclasts in the control and treatment groups on Day 3. C. K5, D. P5 the number of osteoclasts in the control and treatment groups on Day 5. E. K7, F. P7 the number of osteoclasts in the control and treatment groups on Day 7. Positive osteoclast (arrow) examination using (CX22 Binocular, Olympus) at 400x magnification.

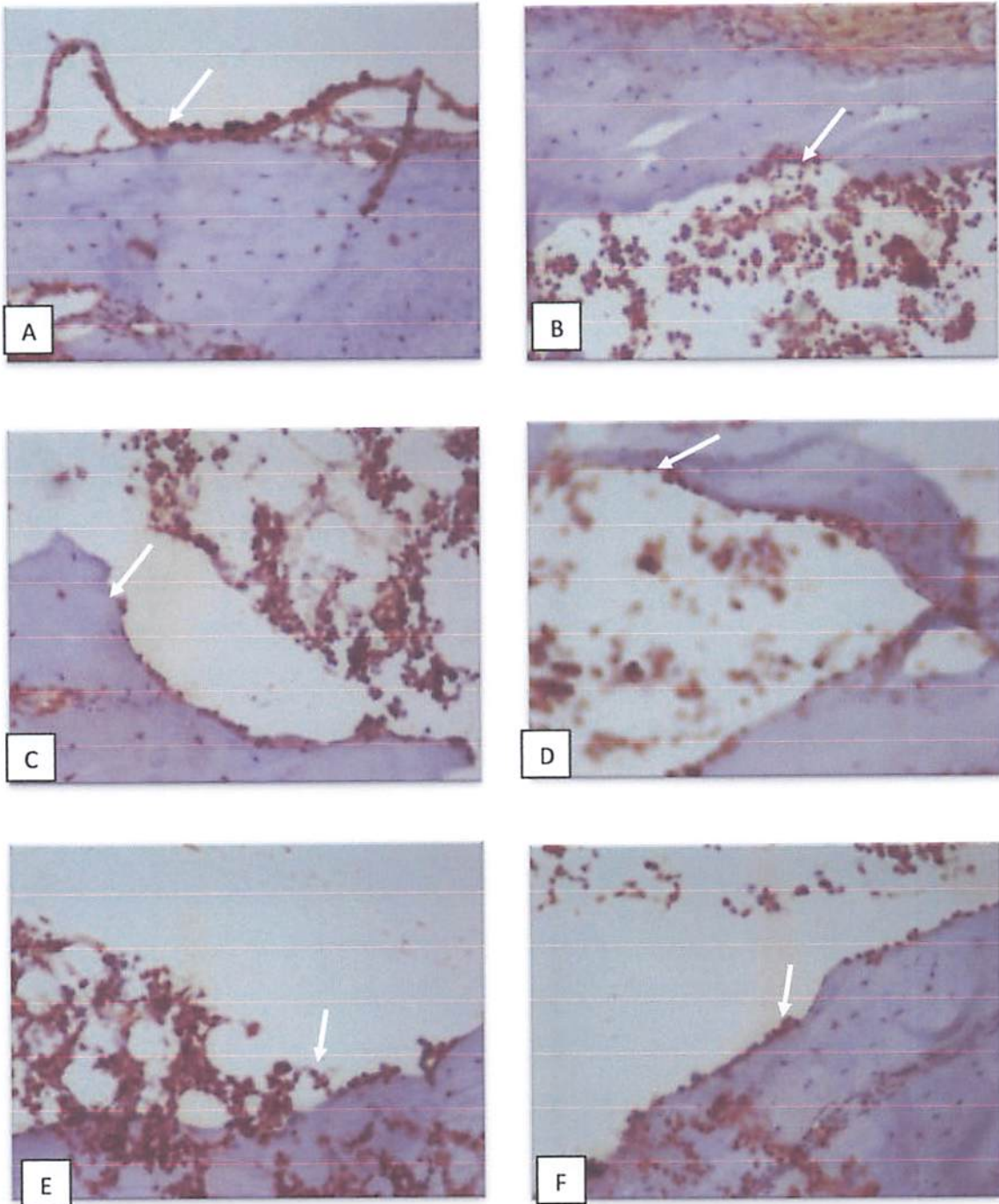


Figure 2. The RANKL expression in Wistar rat (*Rattus Novergicus*) periodontal tissue. A. K3, B. P3 the RANKL expression in the control and treatment groups on Day 3. C. K5, D. P5 the RANKL expression in the control and treatment groups on Day 5. E. K7, F. P7 the RANKL expression in the control and treatment groups on Day 7. Positive RANKL expression (arrow) examination using (CX22 Binocular, Olympus) at 400x magnification.

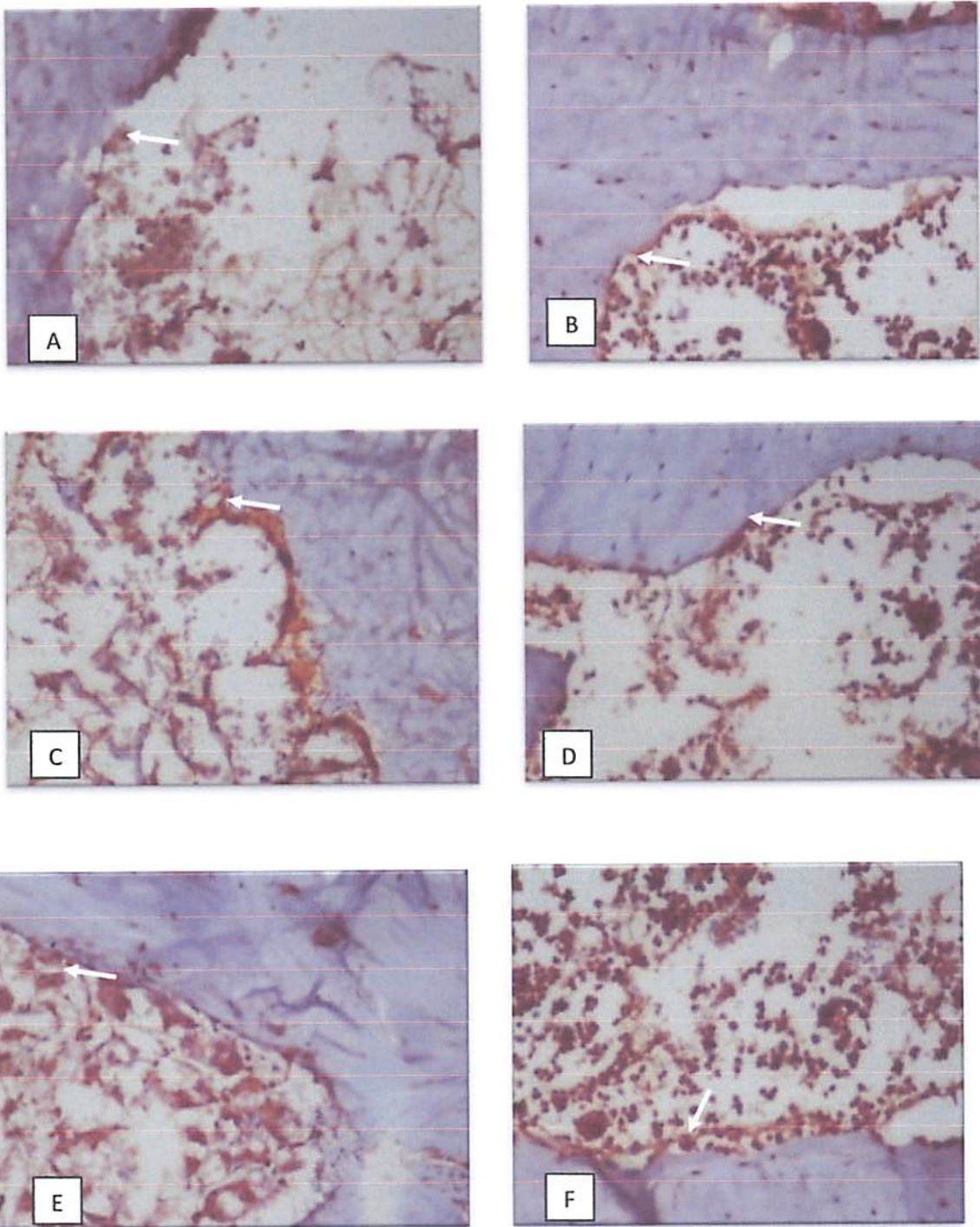


Figure 3. The OPG expression in Wistar rat (*Rattus Novergicus*) periodontal tissue. A. K3, B. P3 the OPG expression in the control and treatment groups on Day 3. C. K5, D. P5 the OPG expression in the control and treatment groups on Day 5. E. K7, F. P7 the OPG expression in the control and treatment groups on Day 7. Positive OPG expression (arrow) examination using (CX22 Binocular, Olympus) at 400x magnification.

Table 3. The result of Mean±SD in osteoclast number of each group.

Time (Day)	Group	Mean±SD
3	K3	7.33 ± 1.211
	P3	4.16 ± 0.752
5	K5	10.0 ± 1.549
	P5	7.0 ± 0.894
7	K7	8.16 ± 2.316
	P7	5.83 ± 0.752

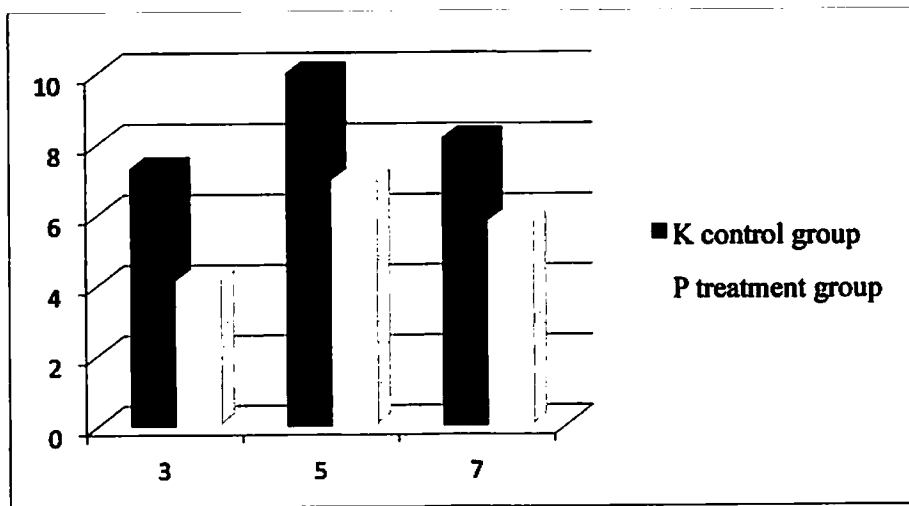


Figure 4. Result of Mean ± SD diagram for the osteoclast number in each group.

Table 4. The result of ANOVA of osteoclast number confirmed significant difference between groups.

Time (Day)	Group	Sig.
3	K3 P3	0.000*
5	K5 P5	0.002*
7	K7 P7	0.040*

Information: *significant at p < 0.05

Table 5. The result of Mean ± SD OPG expression in each group.

Time (Day)	Group	Mean ± SD
3	K3	10.33 ± 1.032
	P3	8.5 ± 1.048
5	K5	11.66 ± 1.366

	P5	9 ± 1.414
7	K7	9 ± 0.894
	P7	6,83 ± 1.169

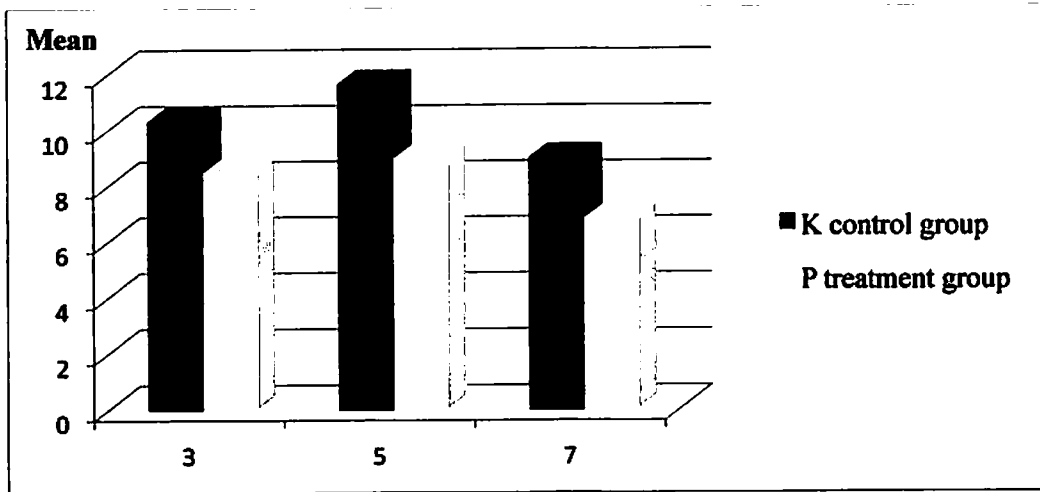


Figure 5. Result of Mean ± SD diagram in OPG expression in each group.

Table 6. The result of ANOVA of OPG expression showed significant difference between groups.

Time (Day)	Group	Sig.
3	K13 K23	0.007*
5	K15 K25	0.012*
7	K17 K27	0.004*

Information: *significant at p<0.05.

Table 7. The result of Mean ± SD RANKL expression in each group.

Time (Day)	Group	Mean ± SD
3	K3	8.33 ± 0.816
	P3	7.33 ± 0.816
5	K5	11.33 ± 1.032
	P5	9.33 ± 1.751
7	K7	10.33 ± 0.816
	P7	8.33 ± 0.752

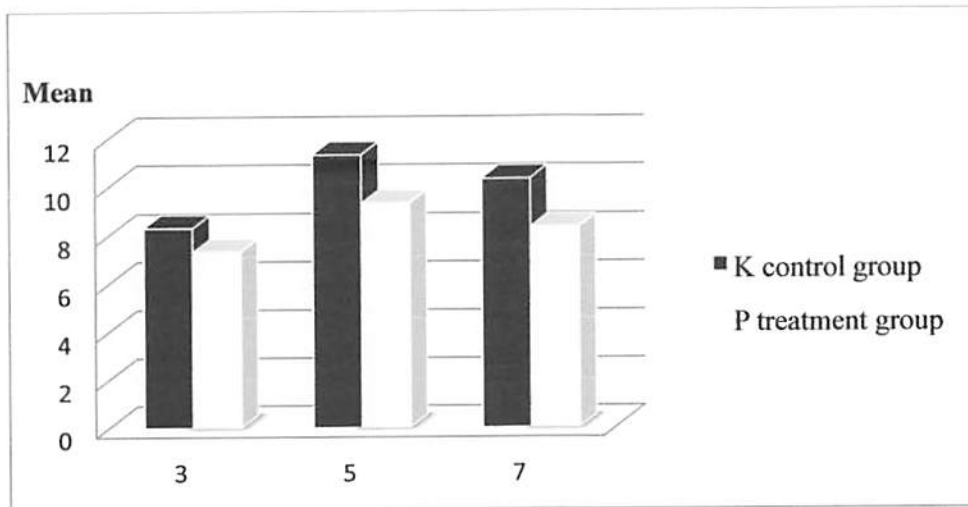


Figure 6. Result of Mean \pm SD diagram in RANKL expression in each group.

Table 8. The result of ANOVA of RANKL expression between groups.

Time (Day)	Group	Sig.
3	K3 P3	0.0599
5	K5 P5	0.0367*
7	K7 P7	0.0079*

Information: *significant at $p < 0.05$

DISCUSSION

Orthodontic movement of the tooth depends on the balance of alveolar bone remodeling. Consumption of Electrolyzed Reduced Water (ERW) / alkaline water can improve this process. In this study, a significant difference existed in the osteoclast number between groups. Orthodontic pressure produced cellular reactions characterized by increased pro-inflammatory cytokines and stimulated RANKL expression. RANKL will bind to RANK on osteoclast precursors that trigger differentiation and osteoclast proliferation resulting in osteoclasts becoming active. Osteoclast activation resulted in bone resorption [11, 12]. Decreased RANKL expression and osteoclast number on day 7 indicated a decrease in osteoclast activity. Kitaura et al., through their research on rats as experimental models given orthodontic strength, state that RANKL expression decreases on day 7 due to reduced orthodontic strength [12]. Based on the results of this study, there was a difference in RANKL expression between each study group, while there was an increase in RANKL expression on

Day 5 and decreased RANKL expression on Day 7. This increase in RANKL expression was due to increased production of pro-inflammatory cytokines that play an important role in osteoclast proliferation and differentiation [12].

The formation and activation of osteoclasts is controlled by cytokines, composed of RANKL, RANK and OPG, which constitute a family group of TNF [13]. RANKL, RANK and OPG are key regulators of bone remodeling, being directly involved in osteoclast differentiation and activation [14]. The formation of RANKL is controlled in response to pro-inflammatory cytokines, such as TNF - α and IL - 1. When RANKL interacts with RANK, intracellular signals may result in the formation of mature multinuclear osteoclasts from osteoclast precursors [13, 14, 15]. The role of RANKL in orthodontic tooth movement is that of binding to RANK to activate osteoclasts resulting in resorption. On the other hand, OPG (Osteoprotegerin) acts as an antagonist receptor. Consequently, when binding to RANKL, it will activate osteoblasts resulting in bone apposition on the tensile area side [16].

In this study, OPG expression was significantly different between groups. Pro-inflammatory cytokines induced by orthodontic forces inhibit the expression of OPG [12]. OPG inhibits RANKL binding of RANK to osteoclast precursors and stimulates osteoclast apoptosis to inhibit osteoclastogenesis. The low RANKL / OPG ratio indicates regeneration and tissue repair. The analytical results for OPG expression showed an increase on day 5 (P5) compared to day 3 and a decrease on day 7 in the treatment group. This decrease in OPG expression is due to increased production of pro-inflammatory cytokines, thus inhibiting OPG expression [17].

In a previous study, it was found that hydrogen-rich water / alkaline water consumption can suppress periodontal inflammation triggered by the use of ligature wire in mice [18]. The hydrogen molecule is known to have antioxidative and anti-inflammatory properties [19]. Hydrogen-rich water consumption causes down-regulation of NF-kB gene expression in periodontal tissue where IL - 1 β production is involved [20]. Consumption of hydrogen-rich water may decrease the expression of IL - 1 β protein, but this study did not show any change in the expression of IL - 1 β protein in experimental models. The consumption of alkaline water can protect against the oxidative damage associated with tissue aging. Alkaline water has the potential to decrease the effects of systemic oxidative damage on periodontal tissues [21]. Oxidative damage contributes to osteoclast differentiation [22]. Hydrogen-rich water consumption can suppress the osteoclast differentiation that

accompanies periodontal inflammation. Consumption of hydrogen water can decrease the number of TRAP - positive osteoclasts on the surface of alveolar bone along with aging. This suggests that hydrogen - rich water has an aging effect on osteoclast differentiation by reducing oxidative damage. Hydrogen - rich water consumption is aimed at reducing alveolar bone loss effectively as a result of aging and / or periodontal inflammation [20, 21, 22].

CONCLUSION

Electrolyzed Reduced Water has an anti - inflammatory effect that significantly decreases the number of osteoclasts, RANKL and OPG expression during orthodontic tooth movement.

DECLARATION

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga (UNAIR), Surabaya, East Java, Indonesia for its support of this research.

CONFLICT OF INTERESTS

No conflict of interest is associated with this work.

CONTRIBUTION OF AUTHORS

The authors declare that this work was undertaken by the author(s) named in this article and all liabilities pertaining to claims relating to its contents will be borne by the authors. All the authors made substantial contributions to this study and/or manuscript and approved the final draft of the paper prior to its submission.

REFERENCE

1. Garbin, AJ., Perin, PCP., Garbin, CAS., Lolli, LF. Malocclusion prevalence and comparison between the Angle classification and the Dental Aesthetic Index in scholars in the interior of Sao Paulo State-Brazil. Dental Press J Orthod, 2010;95.
2. Alkhatib MN., Bedi R., Foster. Ethnic variation in orthodontic treatment in London schoolchildren. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1472/6831/5/8>. Accessed January 5, 2009.

3. Meikle, CM. The Tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *European Journal of Orthodontics* 28. 2006;221 - 40.
4. Ivaska KK., Hentunen TA., Vaaranemi J., Ylipahkala H., Petterson K., Vaananen HK. Release of Intact and Fragmented Osteoclastin Molecules from Bone Matrix During Bone Resorption in Vitro, *J Biol Chem*, 2004;279(18):18361 - 18369.
5. Narmada, IB., and Syafei, A. The Role of Mechanical Force in Molecular and Cellular During Orthodontic Tooth Movement. Surabaya. Universitas Airlangga. 2008;156.
6. Nimeri, G., Kau, CH., Abou - Kheir, NS., Corona, R. Acceleration of Tooth Movement During Orthodontic Treatment – a Frontier in Orthodontics. *Progress in Orthodontic*, 2013;14:42.
7. Seifi, M., Atri, F., Yazdani, MM. Effect of low - laser therapy on orthodontics tooth movement and root resorption after artificial socket preservation. *Dental Research Journal*. 2014;11:61 - 66.
8. Nakae, H., Inaba, H., Effectiveness of Electrolyzed Oxidized Water Irrigation in a Burn - Wound Infection Model *J. Trauma*, 2000;49, 511 — 514.
9. Kasuyama, K., Hydrogen-rich water attenuates experimental periodontitis in rat model. *J Clin Periodontol*. 2011;38:1085 - 1090.
10. Shirahata, S., Kabayama, S., Nakano, M., Miura, T., Kusumoto, K., Gotoh, M., Hayashi, H., Otsubo, K., Morisawa, S., Katakura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 234,269 — 274.
11. Lerner, UH. Osteoblast, Osteoclast, and Osteocytes: Unveiling Their Intimate-Associated Responses to Applied Orthodontic Forces. *Seminars in Orthodontic*, 2012;18(4):243. Available at: <http://dx.doi.org/10.1053/j.sodo.2012.06.002>
12. Kitaura, H., Kimura, K., Ishida, M., Sugisawa, H., Kohara, H., Yoshimatsu, M., Yamamoto, TT. Effect of Cytokines on Osteoclast on Osteoblast Formation and Bone Resorption during Mechanical Force Loading of the Periodontal Membrane. *Scientific World journal*. 2014:1 - 7.
13. Boyle, WJ., Simonet, WS., Lacey, DL. Osteoclast Differentiation and Activation. *Nature*, 2003;423 (6937): 337 - 342.
14. Tanaka, S. Signaling Axis in Osteoclast Biology and Therapeutic Targeting in the RANKL / RANK / OPG System. *Am J Nephrol*, 2007; 27:466 - 47.

15. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, and H. Mitani. Dual Regeneration of Osteoclast Differentiation by Periodontal Ligament Cells through RANKL Stimulation and OPG Inhibition. *J Dent Res*, 2001;80(3):43 - 49.
16. Meeran NA. Cellular response within the periodontal ligament on application of orthodontic forces. *J of Indian Society of Periodontology*, 2013;17(1): 16 - 20.
17. Boyce, BF., and Xing L. Function of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch of Biochem and Biophysics*, 2008;473: 139 - 46.
18. Kasuyama, K. Hydrogen-rich water attenuates experimental periodontitis in rat model. *J Clin Periodontal*. 2011;38: 1085 - 1090.
19. Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., Katsura, K., Katayama, Y., Asoh, S., Ohta, S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.*, 2007;13, 688 - 694.
20. Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J. NF-kappa β activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72: 1493 - 1505.
21. Tsai, SH. TGF- β inhibits IL-1 β -activated PAR-2 Expression Through Multiple Pathways in Human Primary Synovial Cells. *Jurn Biomed Scie*, 2009;16:97.
22. Bloemen, V., Schoenmaker, T., de Vries, TJ., Everts, V. IL-1 β favors osteoclastogenesis via supporting human periodontal ligament fibroblast. *J Cell Biochem*, 2011;112, 1890 - 1897.

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

Inbox x

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi
<info@vetdergikafkas.org>

Nov 1, 2018,
7:46 AM

to me



**KAFKAS ÜN
VETERİNER FAKÜLTESİ**
Journal of the Faculty of Veterinary Medicine

Dear Rini Devijanti Ridwan,

You are subscribed Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi online. Your username and password are as follows:

Username: rini-d-r@fkg.unair.a.cid

Password: #password_no_hash#

You can directly access your user account by clicking the link below.

<http://submit.vetdergikafkas.org>

You can change your personal profile after you login using your password and username. If you encounter any problem while sending a manuscript to our journal, please send an e-mail to info@vetdergikafkas.org

With best regards,

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

info@vetdergikafkas.org

From: **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi** <info@vetdergikafkas.org>
Date: Thu, Nov 1, 2018 at 4:26 PM
Subject: Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi
To: <rini-d-r@fkg.unair.ac.id>



**KAFKAS ÜN
VETERİNER FAKÜ**
Journal of the Faculty of Veterina

Dear Uz. Dr. Rini Devijanti Ridwan,

Some changes are needed on your article named Electrolyzed Reduced Water as an Antioxidant and Anti Inflammatory Agent in Chronic Periodontitis Wistar Rats (*Rattus Novergicus*) which you have sent to Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. We need you to make these changes and send your article again, before the editor evaluation.

Needed changes:

Dear Author,

Abstract should not be consist of subtitle (etc. Context:), please remove it. Please use material and metods instead of Subjects and Methods. Please remove Conclusion title. Please arrange references list according to our rules (etc. Author names should be bold). Best Regards.

Username: rini-d-r@fkg.unair.a.cid

Password: 835b39f920f24cfa5f7ffb28c328a6d5

Sincerely,

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi
Managing Editor
info@vetdergikafkas.org