

LAPORAN TAHUN TERAKHIR
SKEMA KOMPETITIF NASIONAL
PENELITIAN DASAR
PENELITIAN KERJASAMA LUAR NEGERI

KKA
KKA
LP-35/19
See



**SEEKING FOR THE NEW NATURAL COMPOUND FOR
PREVENTIVE MEDICINE OF PERIODONTAL DISEASE BY
REGULATING THE INFLAMMATORY RESPONSE
IN GINGIVAL EPITHELIUM**

Tahun ke 3 dari rencana 3 tahun

RESEARCH TEAM

Irma Josefina Savitri, drg, PhD, SpPerio(K) – NIDN 0016117903
Udijanto Tedjosongko, drg, PhD, SpKGA(K) – NIDN 0001066809
Prof. Dr. Chiquita Prahasanti, drg, SpPerio(K) – NIDN 0009095807
Prof. Kurihara Hidemi, DDS, PhD
Ouhara Kazuhisa, DDS, PhD

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**



HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Seeking for the new natural compound for preventive medicine of periodontal disease by regulating the inflammatory response in gingival epithelium

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : IRMA JOSEFINA SAVITRI, S.KG, S.KG, Ph.D
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0016117903
Jabatan Fungsional : Asisten Ahli
Program Studi : Kedokteran Gigi
Nomor HP : 08165415675
Alamat surel (e-mail) : irma-j-s@fkg.unair.ac.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : UDIJANTO TEDJOSASONGKO S.KG
NIDN : 0001066809
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : Dr. drg CHIQUITA PRAHASANTI S Sp.Perio
NIDN : 0009095807
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : Hiroshima University
Alamat : 1-2-3 Kasumi, Minami-Ku, Hiroshima-Shi, Hiroshima
Penanggung Jawab : Prof. Hidemi Kurihara, DDS, Ph.D
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 3 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 275,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 655,000,000

Mengetahui,
Wakil Dekan I FKG Universitas Airlangga



(Prof. Dr. Anifa Yuliati, drg., M. Kes.)
NIP/NIK 195807091985031001

Kota Surabaya, 13 - 11 - 2018
Ketua,

(IRMA JOSEFINA SAVITRI, S.KG, S.KG,
Ph.D)

NIP/NIK 197911162005012001

Menyetujui,
Ketua LPI Universitas Airlangga



(Prof. H. Hery Rumbasuki, M.Si., Ph.D)
NIP/NIK 196705071991021001



Summary

Periodontal disease is one of two major dental diseases that affect human population worldwide at high prevalence rate. It was reported more than 50 percent people in the world suffer from periodontal disease. Periodontal disease is a chronic inflammatory disease result from the interaction between periodontopathogenic bacteria and host response. Untreated periodontal disease may cause tooth loss. Furthermore, many recent studies reported significant correlation between periodontal disease and systemic diseases like diabetes mellitus, cardiac syndrome, rheumatoid arthritis, and pre-term birth.

Human gingival epithelial cell (HGEC) is the first barrier of periodontal tissue that faces the periodontopathogenic bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*). It is strong recommendation that regulate the immune response in HGEC may contribute to the prevention of periodontitis.

At the end of second year we found the suppressive effect of natural compounds, named Kampo A and Kampo H, against the immune response in HGEC. These two natural medicine suppressed IL-8 and IL-1 β mRNA expression. However the suppressive effect were not shown in TLR2 nor TNF α mRNA expression. The suppressive effect did not shown in the protein production of IL-8 either. The results have been presented in Thailand International Conference on Oral Biology (Bangkok-Thailand, November 17th – 18th, 2016) and in Asia Pacific Society of Periodontology (Seoul-South Korea, September 22nd – 24th, 2017).

In the third year, the study focus on the mechanism of suppressive effect through *In vitro* and animal experiment. The final goal of the research project is (1) gaining pharmaceutical application for preventive medicine of periodontal disease and (2) patent for new natural compounds. Another ultimate objectives are (3) submitting the result into Journal of Periodontal Research and (4) presenting the study in International seminar every year. To enrich the science in periodontology, we also plan to (5) write a book about “Gingiva as the first barrier in periodontal tissue” and (6) create a model of periodontal tissue visualization.

The results have been presented in The 7th Hiroshima Conference (Hiroshima, Japan 2018)

The collaborative research between Faculty of Dental Medicine Universitas Airlangga-Indonesia and Faculty of Dentistry Hiroshima University-Japan, has been started since 2009 resulted in journal publication in 2014. Conducting the project hold by these two institutions lead the transfer of technology, master the skill in research and advance the science and technology in Indonesia.

Key word: Natural compound, Human Gingival Epithelial Cells, Anti-Inflammation

Acknowledgement

Praise Gratitude is offered to Allah Subhanallah Wata'ala who has given His grace and guidance so that we can finish the 2nd year for research project with title *Seeking for the new natural compound for preventive medicine of periodontal disease by regulating the*

We also would like to express the sincere gratitude to:

1. The Rector of Universitas Airlangga
2. The Chairman of the Research and Innovation Institute Universitas Airlangga
3. Head of Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Ministry of Research, Technology and High Education of Indonesia for research funding
4. Prof. Hidemi Kurihara, DDS, Ph.D, Professor and Chair of Department of Periodontal Medicine, Division of Applied Life Sciences, Institute of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, Japan for this collaborative research project
5. Kazuhisa Ouhara, DDS, Ph.D, Assistant Professor of Periodontal Medicine, Division of Applied Life Sciences, Institute of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, Japan.
6. The Dean of Faculty of Dentistry Universitas Airlangga
7. All member of Periodontic Department, Faculty of Dental Medicine Universitas Airlangga who always support in every step of this research

We hope that this research project can continue to produce international publications and advance the collaborative research in Indonesia

Content

Cover	1
Halaman Pengesahan	2
Summary	3
Acknowledgemen	4
Content	5
Table Content	6
Figure Content	7
Apendix content	8
Chapter 1. Introduction	9
Chapter 2. Literature review	12
Chapter 3. Objective and benefits	18
Chapter 4. Material and Methods	19
Chapter 5. Result and outcomes	20
Chapter 6. Conclusion	25
References	26
Apendix (outcome)	29



Table Content

Table 4.1 Primer sets used in realtime PCR	18
---	-----------

Figure Content

Figure 2.1. Schematic illustration of the surface structure of gram-negative bacteria.
Page. 12

Figure 2.2. The signaling process inside the HGEC. Page. 14

Figure 5.1. Inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of IL-8 mRNA expression stimulated with whole *Porphyromonas gingivalis* in OBA-9 for 12h.
Page. 19

Figure 5.2. Inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of IL-8 mRNA expression stimulated with whole *Porphyromonas gingivalis* in OBA-9 for 24h
Page. 20

Figure 5.3. Inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of IL-1 β mRNA expression stimulated with whole *Porphyromonas gingivalis* in OBA-9
Page. 21

Figure 5.4. Inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of TNF α mRNA expression stimulated with whole *Porphyromonas gingivalis* in OBA-9 12h.
Page. 22

Figure 5.5. Inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of TLR2 mRNA expression stimulated with whole *Porphyromonas gingivalis* in OBA-9 24h
Hal. 23

Appendix (outcome)

- A. Sertificate of poster presenter on Thailand International Conference on Oral Biology (TICOB) 2016 Page. 31
- B. Sertificate of poster presenter on Asia Pacific society of Periodontology (Korea, September 2017) Page 32
- C. Draft buku ajar Page 33
- D. Manuscript of Journal internasional Page 42

Chapter 1 Introduction

Periodontal disease is one of two major dental diseases that affect human population worldwide at high prevalence rate. It was reported more than 50 percent people in the world suffer from periodontal disease (Petersen, 2005). Periodontitis is an infectious and chronic inflammatory disease characterized by the interaction between host and periodontopathogenic bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) and *Aggregibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) (Socransky 1994). The present of *A.a* and *P.g* cause the increasing of GCF that associated with periodontitis (Sánchez, 2015). Untreated periodontitis result in damage in periodontal tissue and tooth loss. Furthermore, it is well known there were strong relationship between periodontitis and systemic disease. Among the associations between oral health status and chronic systemic disease, the link between periodontal disease and diabetes mellitus is the most consistent (Petersen, 2005)

The first line of the interaction between periodontopathogenic bacteria and periodontal tissue is occurred in the epithelial cell (Peyyala, 2013). To avoid the bacterial invasion into periodontal tissue, dentists force the patients to perform plaque control mechanically and chemically. Tooth brushing reduce significantly in periodontitis indicators, such as bleeding on probing, gingival index, pocket depth and plaque index (Aspiras, 2013). However, the increase of average length of the life and the increase of prevalence of systemic disease might cause difficulty of plaque control mechanically. Therefore, finding the new and easy way for protecting periodontal tissue is essential for periodontitis prevention.

Start from 2005, One group from Hiroshima University-Japan lead the project to discover the influence the anti-inflammatory agent for protecting human gingival epithelial cells (HGEC). They reported Irsogladine maleate (IM) influenced the response of gap junctional intercellular communication (GJIC) and IL-8 of HGEC following periodontopathogenic bacterial challenge (Uchida, 2005). IM was also reported regulated some component in HGEC after *A.a* stimulation and a part of mechanism is clarified by molecular biological approach *in vitro*. IM abolished the increasing of IL-8

level through ERK pathway (Kishimoto, 2008). Furthermore, IM countered the effect of IL-1 in GJIC (Fujita, 2008), and regulated neutrophil migration and E-cadherin expression (Fujita, 2010). In addition, IM regulated epithelial barrier function againsts TNF- (Fujita, 2011) and the inflammatory-related genes in HGEC were regulated by IM (Miyagawa, 2013).

In 2014, along with this group, we published for the first time, the effect of IM in HGEC following *P.g* stimulation. IM inhibits *P.g*-mediated expression of TLR2 and IL-8 in HGEC (Savitri, 2014). Regarding this previous study, we believe the preventive medicine have a significant role to protect the HGEC.

Indonesia was rich by verity of natural compounds. Traditionally, the natural compounds were used as a medicine to treat the illness. However the advantages and mechanism of natural compounds in oral cavity, especially in periodontal tissue, were remained unclear.

Since the periodontal disease still at high prevalence rate, the adjunctive technique by using natural compounds to prevent the disease was emerged to conduct. The final goals of the research project are:

1. To get pharmaceutical application for preventive medicine of periodontal disease
2. To create the patent for new natural compounds
3. To submit the result into Journal of Periodontal Research
4. To present the study in International seminar every year.
5. To enrich the science in periodontology, we also plan to write a book about "Gingiva as the first barrier in eriodontal tissue" and design a model of periodontal tissue visualization.

The PCR and ELISA technique were performed to determine the suppressive effect of new natural compound on HGEC inflammation. At the end of second year we found the suppressive effect of some natural compounds, named Kampo A and Kampo H, against the immune response in HGEC. These two natural medicine suppressed IL-8 and IL-1 β mRNA expression. However the suppressive effect were not shown in TLR2 nor TNF α mRNA expression. The suppressive effect did not shown in the protein production of IL-8 either. The results have been presented in Thailand International Conference on Oral Biology, (Bangkok-Thailand, November 17th – 18th, 2016) and in

Asia Pacific Society of Periodontology (Seoul-South Korea, September 22nd – 24th, 2017).

In the third year, the study will focus on suppressive mechanism of natural compound in inflammation. *In vitro* and animal experiment will be performed. The signaling molecules are analyzed by using siRNA transfection and specific inhibitor to clarify the suppressive mechanism at mRNA and protein levels in HGEC. The animal experiment will explain the effect of natural compound through histopathological technique.

These 3 years study conduct in two institutions, Faculty of Dental Medicine Universitas Airlangga-Indonesia and Faculty of Dentistry Hiroshima University-Japan. As shown in references, Hiroshima University has the high throughout system for analyzing the effect of some chemicals and natural compounds including oriental medicine are available. Conducting the project hold by these two institutions lead the transfer of technology, master the skill in research and advance the science and technology in Indonesia.

The record of our previous research made the collaborative research visible to be conducted. International journal have been published by our collaborative project, they are: Irsogladine maleate inhibits *Porphyromonas gingivalis*-mediated expression of toll-like receptor 2 and interleukin-8 in human gingival epithelial cells (Savitri, 2014) ; miR-584 Expressed in Human Gingival Epithelial Cells is Induced by *Porphyromonas Gingivalis* Stimulation and Regulates Interleukin-8 Production via Lactoferrin Receptor (Ouhara, 2014); and The differential expression of *mgl* mRNA by *Porphyromonas Gingivalis* affects the production of methyl mercaptan (Ouhara, 2015).

Chapter 2. Literature Review



The aim of this research is Seeking for the new natural compound for preventive medicine of periodontal disease by regulating the inflammatory response in gingival epithelium. We hypothesis the natural compound is the anti inflammatory agent and may suppress the immune response in Human Gingival Epithelial Cells (HGEC).

The Road Map of The Research

Previous study showed OBA-9 expresses the innate immunity-related genes, TLR2 and TLR4 (Kusumoto, 2004). A previous report also indicated that *P.g* binds to TLR2 and induces an inflammatory response (Lu, 2009). Our previous study confirmed the suppressive effect of Irsogladine maleate (IM) in HGEC following *P.g* stimulation. IM inhibits *P.g*-mediated expression of TLR2 and IL-8 in HGEC (Savitri, 2014).

In our experiment we found different result. Kampo A dan Kampo H suppressed IL-8 and IL-1 β mRNA expression, but the suppressive effect were not shown in TLR2, TNF α mRNA expression, IL-8 protein production either. We assume there are other pathways of natural compound to regulate the inflammatry process in periodontal tissue. Since we found the different respons between IM and two natural compound that we use in this study (Kampo A and Kampo H), it is necessary to continue the study and observe further process of anti inflammatory agent in periodontal disease by regulating the inflammatory process in HGEC. The raod map of the research explain in figure 2.1.

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Research Road Map

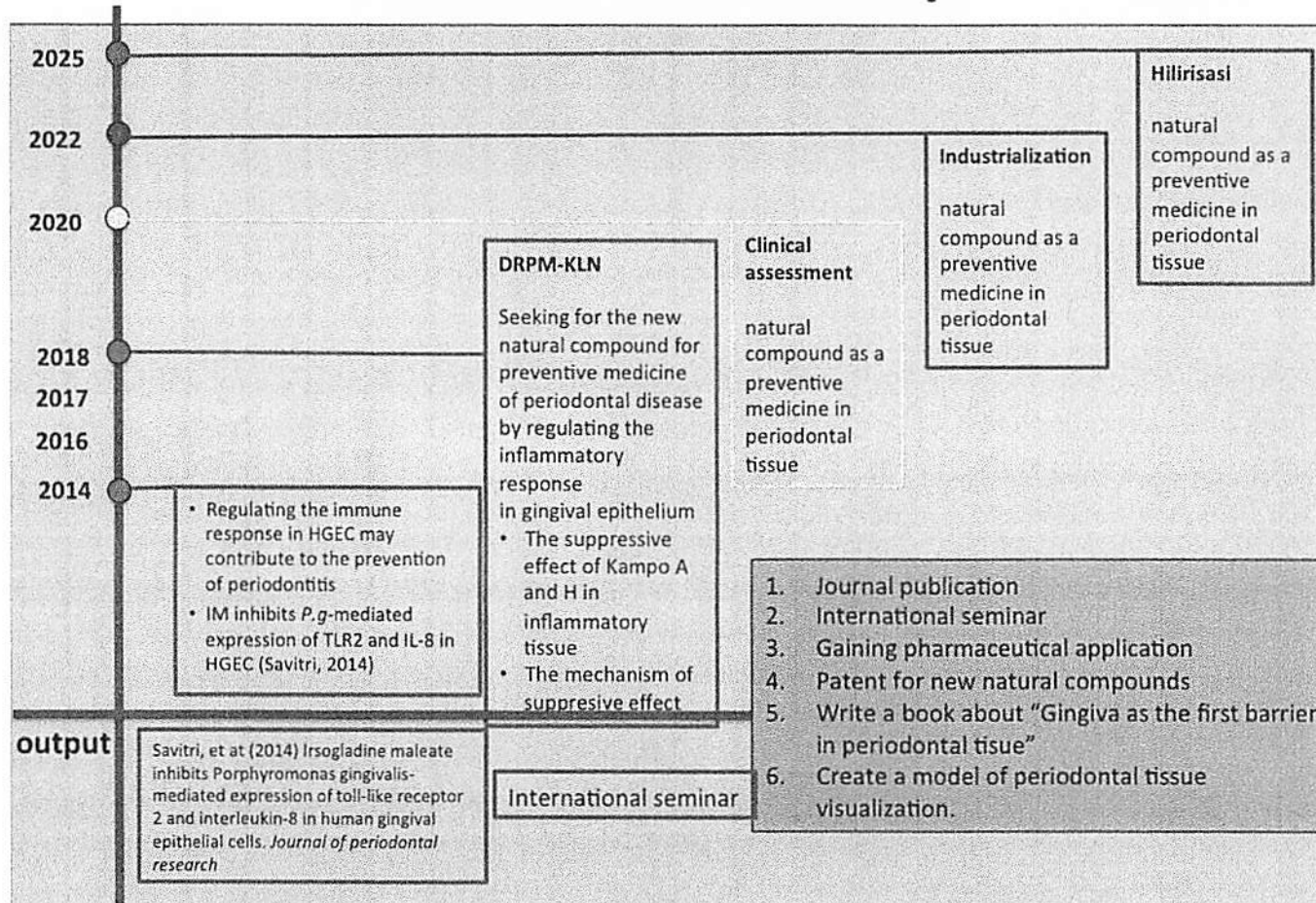


Fig. 2.1 Research road map

The role of Periodontopathogenic bacteria in inflammatory process

Periodontitis is a chronic inflammatory and infectious disease characterized by the interaction between periodontal tissue and periodontopathogenic bacteria such as *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) and *Aggregibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) (Socransky 1994). The cell envelope of the gram-negative bacterium consists of two distinct membranes, the inner (cytoplasmic) membrane and the outer membrane (Yoshimura, 2009). The inner membrane is a phospholipid bilayer, while the outer membrane is a phospholipid with an inner leaflet of phospholipid and an outer leaflet of lipopolysaccharide (Fig. 2.2).

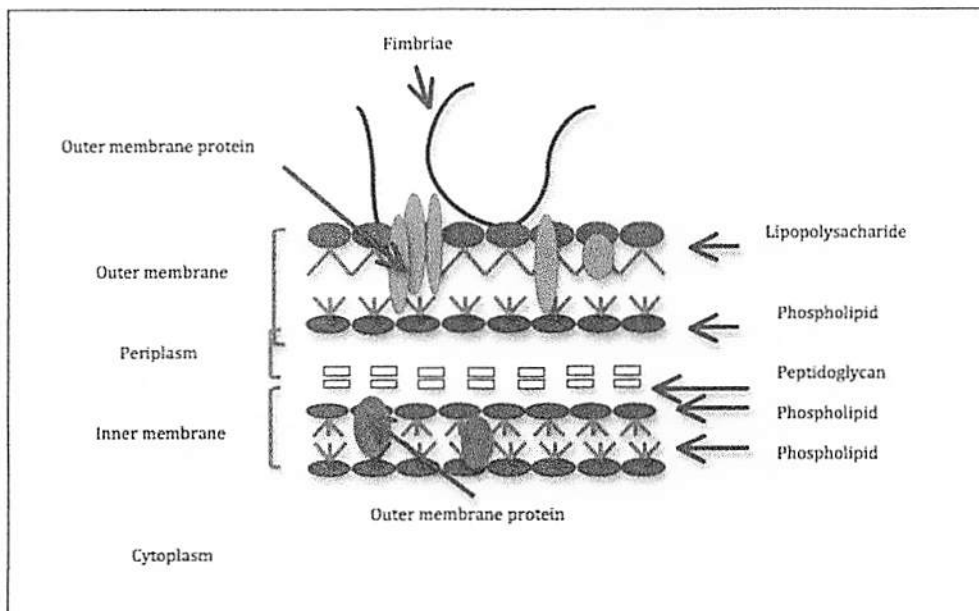


Fig. 2.2. Schematic illustration of the surface structure of gram-negative bacteria. (modified from Yoshimura, 2009)

Some components in the membrane of bacteria are well known to produce pathogenic factors, such as outer membrane protein (Omp) (Bosshardt, 2005; Fujita, 2008), leukotoxin (Fujita, 2012), and protease (Wang, 2001) that induce inflammation in gingival tissue (Kadowaki, 2000). These bacteria also possess lipopolysaccharide (LPS) in the outer membrane as a modulator of inflammation (Ouhara, 2006).

As first barrier in periodontal tissue, the inflammatory process will occur in the epithelial cells following *A.a* or *P.g*, infection. The inflammation is needed as a protection in the host body. However, over production of inflammatory cytokines caused

the extension of the chronic inflammation and destruct the periodontal tissue. The prolong inflammation will activate some component in immune system that cause the damage in periodontal tissue. The immune response plays an essential role in the breakdown of connective tissue and alveolar bone (Asakawa, 2003; Inagaki, 2003; Kelk, 2011). *Therefore, we need to conduct the effective prevention of periodontitis by eliminating periodontopathogenic bacteria and regulating host immune response.*

Human gingival epithelial cells (HGEC) as a first barrier of periodontal tissue

HGEC are suggested as the first barrier of periodontal tissue that face very frequently periodontopathogenic bacteria and actively contribute the inflammation in periodontal tissue (Teng, 2000). Inside the sulcus, the protection from HGEC formed by two types of epithelial, oral sulcular epithelium and junctional epithelium

Junctional epithelium is the epithelial component of the dento-gingival unit that is in contact with the tooth surface. The junctional epithelium may be regarded as the most interesting structure of the gingiva that important in the tissue homeostasis and defense against microorganism and their product. In contrast to most other epithelial, there is no keratinizing epithelial layer at the surface of junctional epithelium that could function as a physical barrier. The lack of tight physical seal by the junctional epithelium may also allow bacteria and their product to penetrate the junctional epithelium (Bosshardt, 2004).

The protection of HGEC comes from interconnection between cell to another one by desmosome, and occasionally by gap junction (Bosshardt, 2004; Fujita, 2011). Beside tissue integrity, HGEC also express various molecules that maintenance the normal architecture and functions. Cell adhesion molecules (ex. E-cadherin) cytokines (ex. IL-8, IL-1 β , TNF- α), growth factors, natural antimicrobial peptides and protein were present in the HGEC (Bosshardt, 2004).

Other components on the surface of HGEC, Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4, also present on the surface of HGEC. The function of these receptors is recognize the component of bacteria, such as peptidoglycan, Outer membrane protein 29 (Omp29), and lipopolysaccharide that trigger the signaling process inside the cells. The signaling process will induce some gene, in this case inflammatory related genes, to produce inflammatory cytokines (Fig. 2.3) (Wang, 2001; Gelani, 2009; Funderburg, 2007).

Irsogladine maleate (IM), is the anti-inflammatory agent function as the regulator of HGEC. IM could regulate the integrity of the cells and pro-inflammatory through ERK pathways (Kishimoto, 2008; Fujita, 2008; Fujita, 2010; Fujita, 2011; Miyagawa, 2013; Savitri, 2014). *Since HGEC is the first barrier for periodontal tissue and as an innate immunity, regulating the inflammatory process in HGEC is necessary to prevent periodontal disease.*

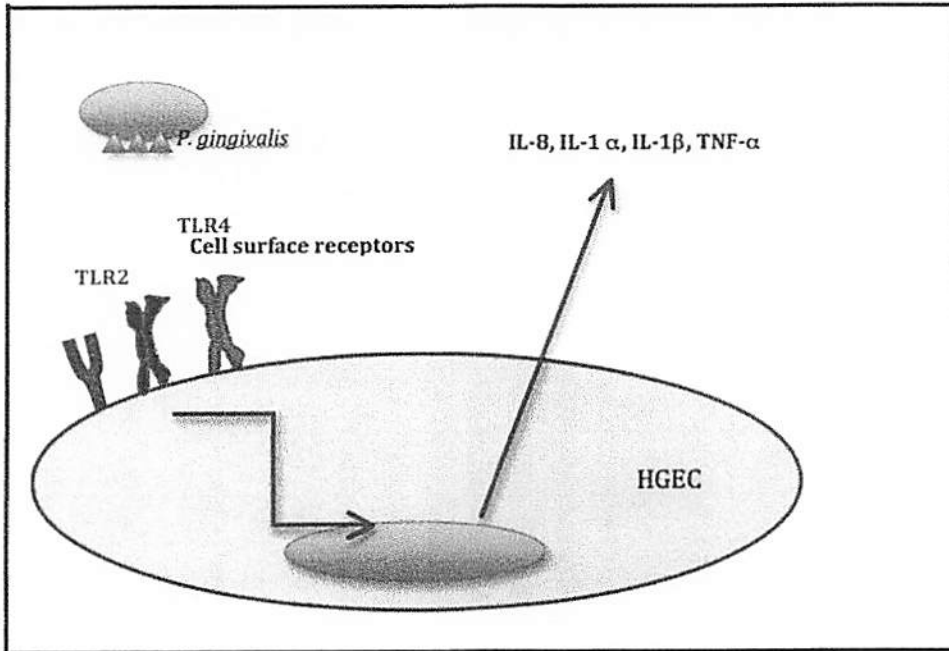


Fig. 2.3. The signaling process inside the HGEC. The cell surface receptors recognized the component of *P. gingivalis*, send the signal to the nucleus and produce cytokines.

Natural compound

Indonesia was rich by verity of natural compounds. Traditionally the natural compounds were used as a medicine to treat the illness. However the advantages and mechanism of natural compounds in oral cavity, especially in periodontal tissue, were remained unclear.

Some studies show the potential of natural compound as a medicine. Kouboku is a tradisional Chinese herb that is widely used in Asia for the treatment of inflammation. *Gardenia jasminoides* downregulated inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-1β and

IFN- γ in the mice model (Song, 2014) One thousand milligram *Zingiber officinale* reduce fasting glucose, which is a risk factor for inflammation in vascular (Imani, 2015). Flavonoid from *Houttuynia cordata* attenuates lung inflammation in mice (Lee, 2015). *Glycyrrhiza* impairs inflammatory chemokine production by inhibiting activation of STAT1 and NF- κ B in HaCaT cells (Jeong, 2015). The effect of a dentifrice containing Magnolia extract (*magnoliaceae*) reduce plaque and gingivitis in man (Hellstrom, 2014). Anti-inflammatory homoisoflavonoids from the tuberous roots of *Ophiopogon japonicus* (Li, 2012). *Based on this finding the natural compounds is a potential anti-inflammatory agent in periodontal disease.*

Chapter 3. Objectives and Benefits

The objectives of this study are :

1. To find the new compounds for regulation of inflammatory response in periodontal tissue
2. To determine the suppressive mechanism of inflammation by natural compound, and to make sure the suppressive effect of natural compounds in animal experiment.
3. To conduct the new patent for pharmaceutical application as a preventive medicine for periodontal disease.
4. To publish the result of this project in international publication.

Another advantage of doing this collaborative research is continuing the previous study that has been started by the researcher from two institutions. Therefore, it is very easy to start the experiment immediately, the expected result will be gained as soon as possible and the new preventive medicine for periodontitis will be created for human being.

Chapter 4 Materials & Methods

Exp. 1 Finding the new oriental medicine (components) for anti-inflammation

Natural Compound Preparation:

Kampo A (registered name: HG06039) and Kampo H (registered name: OH81035) provided by Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd. Natural compound were diluted in water or Dymethyl Sulfovide up to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

Cell Culture

OBA-9 is the immortalized epithelial cells derived from human gingival tissue (HGEC) kindly gifted by Shinya Murakami from Osaka University Japan. OBA-9 was maintained in Humedia-KG2 medium 1. The cultured medium 1 supplemented with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ human epidermal growth factor (hEGF), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hydrocortisone-hemmisuccinate, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin and 2 ml bovine pituitary extract (BPE). The cultured medium 2 for bacterial stimulation was not added with any supplement. HGEC were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 $^\circ\text{C}$.

Bacterial Preparation

P. gingivalis W83 (purchased from the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was cultured on a sheep blood agar plate using the Anaeropack system (Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo, Japan) at 37 $^\circ\text{C}$. After 2 days of incubation in the Anaeropack system, *P. gingivalis* was inoculated into 40 mL of trypticase soy broth supplemented with 1% yeast extract, hemin (200 μg) and menadione (20 μg). *P. gingivalis* was harvested at the exponential growth phase and washed with phosphate buffered saline (PBS). *P. gingivalis* were treated with formaline fix technique. Briefly, the equal volume of 10% formalin was added into *P. gingivalis* solution and keep in 4 $^\circ\text{C}$ overnight. *P. gingivalis* was washed in PBS and keep in PBS at the final volume 1 mL. Cell counting was performed.

Champter 5 Result and Outcome

To determine the inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of IL-8 mRNA expression in OBA-9, cells were stimulated with *P. gingivalis* for 12h (figure 5.1) and 24h (figure 5.2) in the presence or absence of Kampo A or Kampo H. The enhancement of IL-8 mRNA expression in *P. gingivalis*-stimulated OBA-9 was 7.0-fold and 34-fold higher than that with no stimulation. However, the enhancement was suppressed by the presence of Kampo A or Kampo H. The addition of Kampo A or Kampo H in the *P.gingivalis*-nonstimulated OBA-9 did not give any effect on the expression of IL-8 mRNA expression compared with control group (figure 5.1 and figure 5.2, respectively).

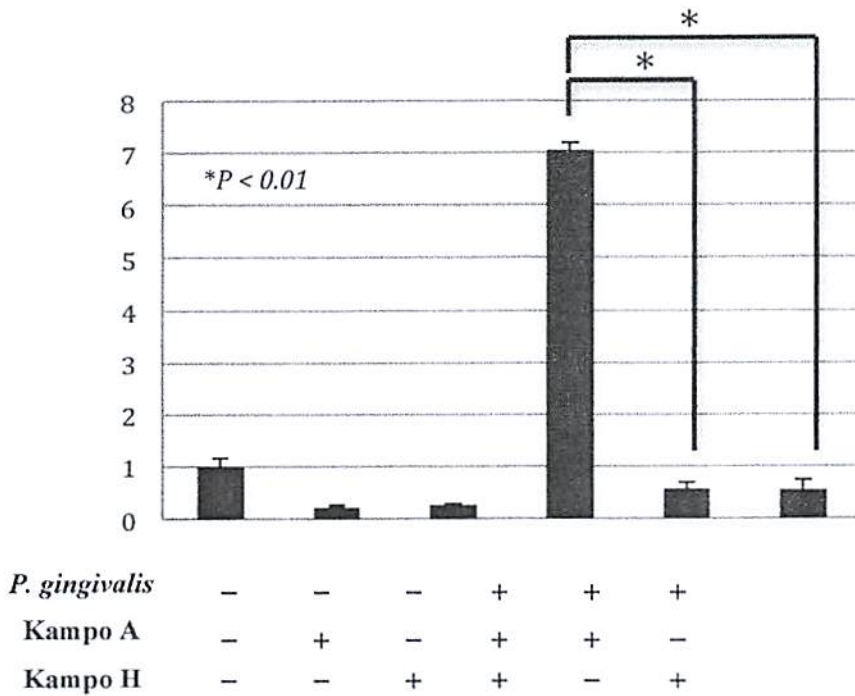


Figure 5.1. Inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of IL-8 mRNA expression stimulated with whole *Porphyromonas gingivalis* in OBA-9 for 12h. To study the inhibitory effect of Kampo A or Kampo H in OBA-9, Kampo A or Kampo H was added to subconfluent cultures of OBA-9, 30 min before stimulation with *P. gingivalis* whole cells (10^8 colony-forming units/mL). To determine expression of IL-8 mRNA, total RNA was extracted and real-time PCR

was performed. The values represent the mean + SD of triplicate experiments. *p < 0.01, significantly lower than untreated cells (Student's t-test).

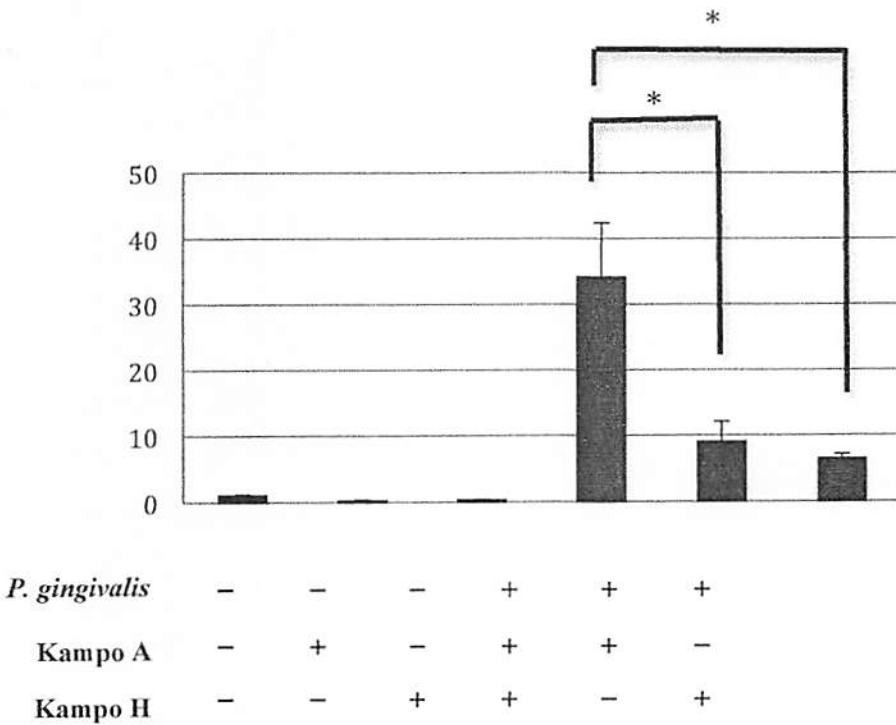


Figure 5.2. Inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of IL-8 mRNA expression stimulated with whole *Porphyromonas gingivalis* in OBA-9 for 24h. To study the inhibitory effect of Kampo A or Kampo H in OBA-9, Kampo A or Kampo H was added to subconfluent cultures of OBA-9, 30 min before stimulation with *P. gingivalis* whole cells (10^8 colony-forming units/mL). To determine expression of IL-8 mRNA, total RNA was extracted and real-time PCR was performed. The values represent the mean + SD of triplicate experiments. *p < 0.01, significantly lower than untreated cells (Student's t-test)

To determine the inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of IL-1 β mRNA expression in OBA-9, cells were stimulated with *P. gingivalis* for 12h in the presence or absence of Kampo A or Kampo H. The enhancement of IL-1 β mRNA expression in *P. gingivalis*-stimulated OBA-9 was 16.0-fold higher than that with no stimulation. However, the pretreatment of traditional Chinese medicine on the cells suppressed IL-1 β mRNA expression. Kampo A suppressed 87% and Kampo H suppressed 93%. The addition of Kampo A or Kampo H in the *P.gingivalis*-unstimulated OBA-9 did not give any effect on the expression of IL-1 β mRNA expression compared with control group (Figure 5.3).

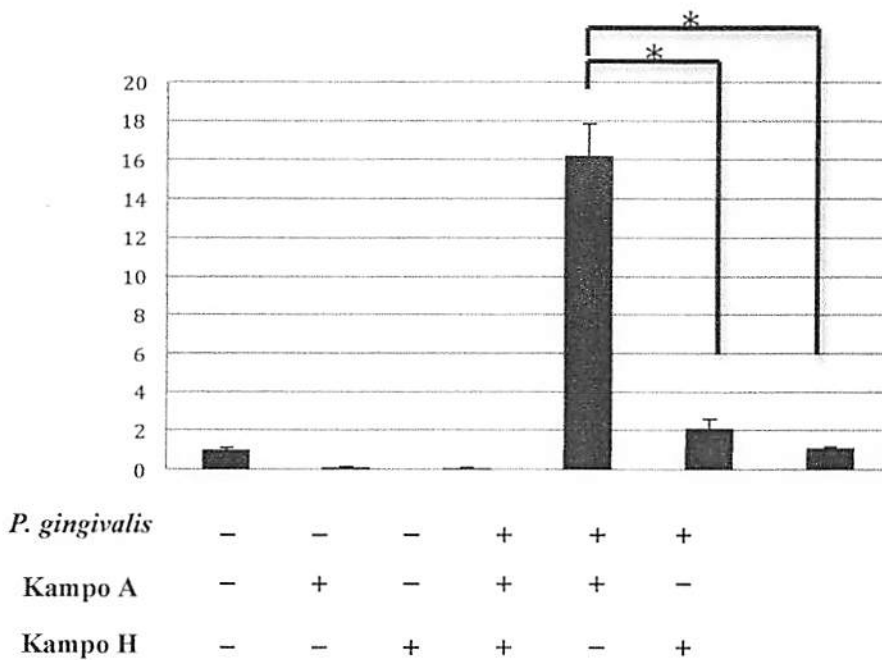
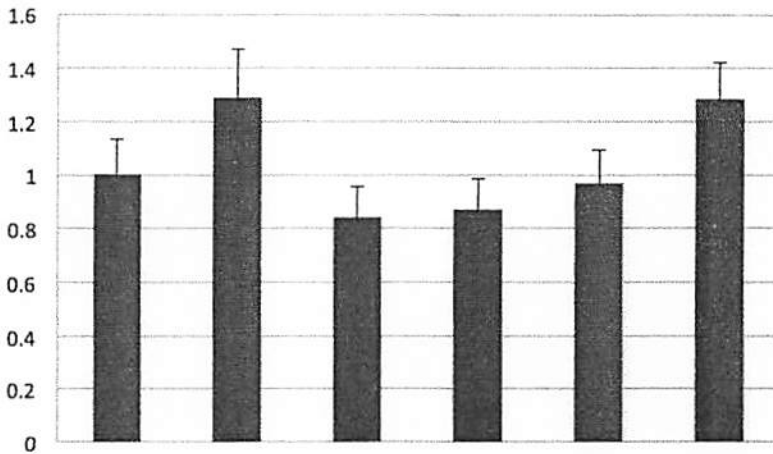


Figure 5.3. Inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of IL-1 β mRNA expression stimulated with whole *Porphyromonas gingivalis* in OBA-9 12h. To study the inhibitory effect of Kampo A or Kampo H in OBA-9, Kampo A or Kampo H was added to subconfluent cultures of OBA-9, 30 min before stimulation with *P. gingivalis* whole cells (10^8 colony-forming units/mL). To determine expression of IL-1 β mRNA, total RNA was extracted and real-time PCR was performed. The values represent the mean + SD of triplicate experiments. * $p < 0.01$, significantly lower than untreated cells (Student's t-test)

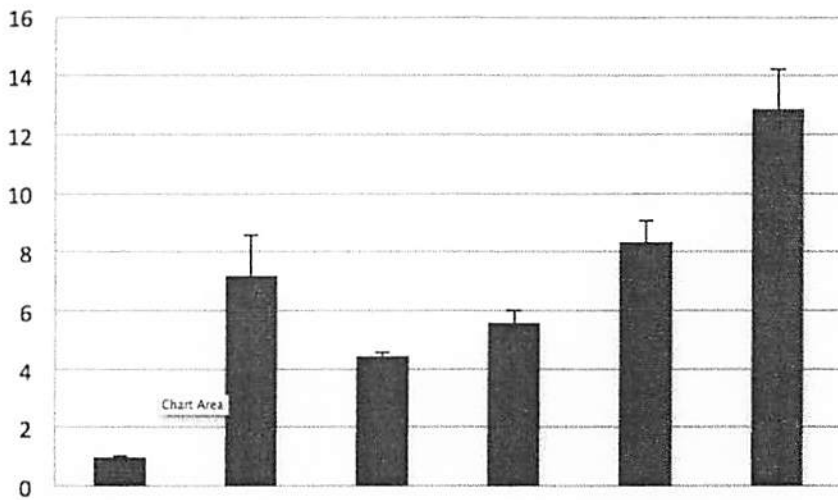
To determine the inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of TNF α mRNA expression in OBA-9, cells were stimulated with *P. gingivalis* for 12h in the presence or absence of Kampo A or Kampo H. *P. gingivalis* did not stimulate OBA-9 nor Kampo medicine did not show any effect (figure 5.4).



<i>P. gingivalis</i>	-	-	-	+	+	+
Kampo A	-	+	-	+	+	-
Kampo H	-	-	+	+	-	+

Figure 5.4. Inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of TNF α mRNA expression stimulated with whole Porphyromonas gingivalis in OBA-9 12h. To study the inhibitory effect of Kampo A or Kampo H in OBA-9, Kampo A or Kampo H was added to subconfluent cultures of OBA-9, 30 min before stimulation with *P. gingivalis* whole cells (10^8 colony-forming units/mL). To determine expression of TNF α mRNA, total RNA was extracted and real-time PCR was performed. The values represent the mean + SD of triplicate experiments.

To determine the inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of TLR2 mRNA expression in OBA-9, cells were stimulated with *P. gingivalis* for 24h in the presence or absence of Kampo A or Kampo H. The enhancement of TLR2 mRNA expression in *P. gingivalis*-stimulated OBA-9 was 7.0-fold higher than that with no stimulation. However, Kampo A and Kampo H did not show any effect (figure 5.5).



<i>P. gingivalis</i>	-	-	-	+	+	+
Kampo A	-	+	-	+	+	-
Kampo H	-	-	+	+	-	+

Figure 5.5. Inhibitory effect of Kampo A or Kampo H on enhancement of TLR2 mRNA expression stimulated with whole *Porphyromonas gingivalis* in OBA-9. To study the inhibitory effect of Kampo A or Kampo H in OBA-9, Kampo A or Kampo H was added to subconfluent cultures of OBA-9, 30 min before stimulation with *P. gingivalis* whole cells (10^8 colony-forming units/mL). To determine expression TLR2 mRNA, total RNA was extracted and real-time PCR was performed. The values represent the mean + SD of triplicate experiments.

Chapter 7

Conclusion and suggestion

1. Kouboku show suppressive effect on IL-8 and IL-1 β . However, they did not show any effect on TLR2 nor TNF α
2. *P. gingivalis* seems not induce TNF α mRNA expression. It might be caused by short period of stimulation of the cell. Longer period of stimulation will be needed to induce TNF α mRNA expression.
3. Kouboku show the opposite effect on TLR2 and TNF α . This result show the Kouboku may have different pathway in the process of HGEC regulation.



References

- Asakawa R, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Goncalves RB, Izumi S, Fujiwara T, Nakano Y, Suzuki N, Uchida Y, Ouhara K, Shiba H, Taubman MA, Kurihara H, Sugai M. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol*. 2003 Nov;50(4):1125-39.
- Aspiras MB, Barros SP, Moss KL, Barrow DA, Phillips ST, Mendoza L, de Jager M, Ward M, Offenbacher S. (2013) Clinical and subclinical effects of power brushing following experimental induction of biofilm overgrowth in subjects representing a spectrum of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. Dec;40(12):1118-25.
- Bosshardt DD, Lang NP. (2005) The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res*. Jan;84(1):9-20
- Fujita T, Ashikaga A, Shiba H, Kajiya M, Kishimoto A, Hirata R, Tsunekuni N, Hirono C, Kawaguchi H, Shiba Y, Kurihara H. (2008) Irsogladine maleate counters the interleukin-1 beta-induced suppression in gap-junctional intercellular communication but does not affect the interleukin-1 beta-induced zonula occludens protein-1 levels in human gingival epithelial cells. *J Periodontal Res*. Feb;43(1):96-102.
- Fujita, T., Kishimoto, A., Shiba, H., Hayashida, K., Kajiya, M., Uchida, Y., Matsuda, S., Takeda, K., Ouhara, K., Kawaguchi, H., Abiko, Y., and Kurihara, H. (2010) Irsogladine maleate regulates neutrophil migration and E-cadherin expression in gingival epithelium stimulated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Biochemical pharmacology* 79, 1496-1505
- Fujita, T., Yumoto, H., Shiba, H., Ouhara, K., Miyagawa, T., Nagahara, T., Matsuda, S., Kawaguchi, H., Matsuo, T., Murakami, S., and Kurihara, H. (2012) Irsogladine maleate regulates epithelial barrier function in tumor necrosis factor-alpha-stimulated human gingival epithelial cells. *Journal of periodontal research* 47, 55-61
- Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, Drage MG, Jadowsky J, Harding CV, Weinberg A, Sieg SF. (2007) Human α -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 20;104(47):18631-5
- Hellström MK1, Ramberg P. (2014) The effect of a dentifrice containing Magnolia extract on established plaque and gingivitis in man: a six-month clinical study. *Int J Dent Hyg*. May;12(2):96-102.
- Imani H, Tabibi H, Najafi I, Atabak S, Hedayati M, Rahmani L. (2015) Effects of ginger on serum glucose, advanced glycation end products, and inflammation in peritoneal dialysis patients. *Nutrition*. May;31(5):703-7.
- Inagaki S, Ishihara K, Yasaki Y, Yamada S, Okuda K. Antibody responses of (2003) periodontitis patients to gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol*. Oct;74(10):1432-9.
- Jeong SJ1, Lim HS2, Seo CS1, Kim JH3, Jin SE1, Yoo SR1, Shin HK4. (2015) Traditional herbal formula Jakyakgamcho-tang (*Paeonia lactiflora* and *Glycyrrhiza uralensis*) impairs inflammatory chemokine production by inhibiting activation of STAT1 and NF- κ B in HaCaT cells. *Phytomedicine*. 2015 Feb 15;22(2):326-32.
- Kadowaki T, Nakayama K, Okamoto K, Abe N, Baba A, Shi Y, et al. (2000) *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. *J Biochem* 128:153-9.

- Kawai, T., Paster, B. J., Komatsuzawa, H., Ernst, C. W., Goncalves, R. B., Sasaki, H., Ouhara, K., Stashenko, P. P., Sugai, M., and Taubman, M. A. (2007) Cross-reactive adaptive immune response to oral commensal bacteria results in an induction of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)-dependent periodontal bone resorption in a mouse model. *Oral microbiology and immunology* 22, 208-215
- Kelk P, Abd H, Claesson R, Sandström G, Sjöstedt A, Johansson A. (2011) Cellular and molecular response of human macrophages exposed to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Cell Death Dis.* Mar 10;2:e126.
- Kishimoto A, Fujita T, Shiba H, Komatsuzawa H, Takeda K, Kajiya M, Hayashida K, Kawaguchi H, Kurihara H. (2008) Irsogladine maleate abolishes the increase in interleukin-8 levels caused by outer membrane protein 29 from *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* through the ERK pathway in human gingival epithelial cells. *vJ Periodontal Res.* Oct;43(5):508-13.
- Kusumoto Y, Hirano H, Saitoh K et al. Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. *J Periodontol* 2004;75:370–379.
- Lee JH, Ahn J, Kim JW, Lee SG, Kim HP. (2015) Flavonoids from the aerial parts of *Houttuynia cordata* attenuate lung inflammation in mice. *Arch Pharm Res.* Mar 6.
- Li N, Zhang JY, Zeng KW, Zhang L, Che YY, Tu PF. (2012) Anti-inflammatory homoisoflavonoids from the tuberous roots of *Ophiopogon japonicus*. *Fitoterapia.* Sep;83(6):1042-5.
- Lu Q, Darveau RP, Samaranayake LP, Wang CY, Jin L. Differential modulation of human {beta}-defensins expression in human gingival epithelia by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide with tetra- and penta-acylated lipid A structures. *Innate Immun* 2009;15:325–335.
- Miyagawa, T., Fujita, T., Ouhara, K., Matsuda, S., Kajiya, M., Hayashida, K., Imai, H., Yoshimoto, T., Iwata, T., Shiba, H., Abiko, Y., and Kurihara, H. (2013) Irsogladine maleate regulates the inflammatory related genes in human gingival epithelial cells stimulated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *International immunopharmacology* 15, 340-347
- Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Shiba, H., Uchida, Y., Kawai, T., Sayama, K., Hashimoto, K., Taubman, M. A., Kurihara, H., and Sugai, M. (2006) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of beta-defensin and the 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells. *Infection and immunity* 74, 5211-5220
- Ouhara K, Savitri IJ, Fujita T, Kittaka M, Kajiya M, Iwata T, Miyagawa T, Yamakawa M, Shiba H, Kurihara H. (2014) miR-584 expressed in human gingival epithelial cells is induced by *Porphyromonas gingivalis* stimulation and regulates interleukin-8 production via lactoferrin receptor. *J Periodontol.* 2014 Jun;85(6):e198-204.
- K Ouhara, Y Iwasaki, M Kajiya, IJ Savitri, M Kitagawa, N Tokunaga, T Shintani, I Ogawa, T Hino, T Fujita, H Shiba, H Kurihara (2015) The differential expression of mgl mRNA by *Porphyromonas gingivalis* affects the production of methyl mercaptan. *Oral Disease* (21) p 626-633
- Petersen PE, Ogawa H. (2005) Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol.* Dec;76(12):2187-93
- Peyyala R, Kirakodu SS, Novak KF, Ebersole JL, (2013) Oral epithelial cell responses to multispecies microbial biofilms. *J Dent Res.* 2013 Mar;92(3):235-40

Socransky SS, Haffajee AD. (1994) Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl.* :S684-5, 8-93; quiz S714-7.

Sánchez GA, Acquier AB, De Couto A, Busch L, Mendez CF. (2015) Association between *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque and clinical parameters, in Argentine patients with aggressive periodontitis. *Microb Pathog.* Mar 24;82:31-36.

Savitri, I. J., Ouhara, K., Fujita, T., Kajiya, M., Miyagawa, T., Kittaka, M., Yamakawa, M., Shiba, H., and Kurihara, H. (2014) Irsogladine maleate inhibits *Porphyromonas gingivalis*-mediated expression of toll-like receptor 2 and interleukin-8 in human gingival epithelial cells. *Journal of periodontal research*

Song X, Zhang W, Wang T, Jiang H, Zhang Z, Fu Y, Yang Z, Cao Y, Zhang N. (2014) Geniposide plays an anti-inflammatory role via regulating TLR4 and downstream signaling pathways in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. *Inflammation.* Oct;37(5):1588-98.

Teng YT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, et al. (2000) Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* ;106:R59-67.

Uchida Y, Shiba H, Komatsuzawa H, Hirono C, Ashikaga A, Fujita T, Kawaguchi H, Sugai M, Shiba Y, Kurihara H. (2005) Irsogladine maleate influences the response of gap junctional intercellular communication and IL-8 of human gingival epithelial cells following periodontopathogenic bacterial challenge. *Biochem Biophys Res Commun.* Jul 29;333(2):502-7.

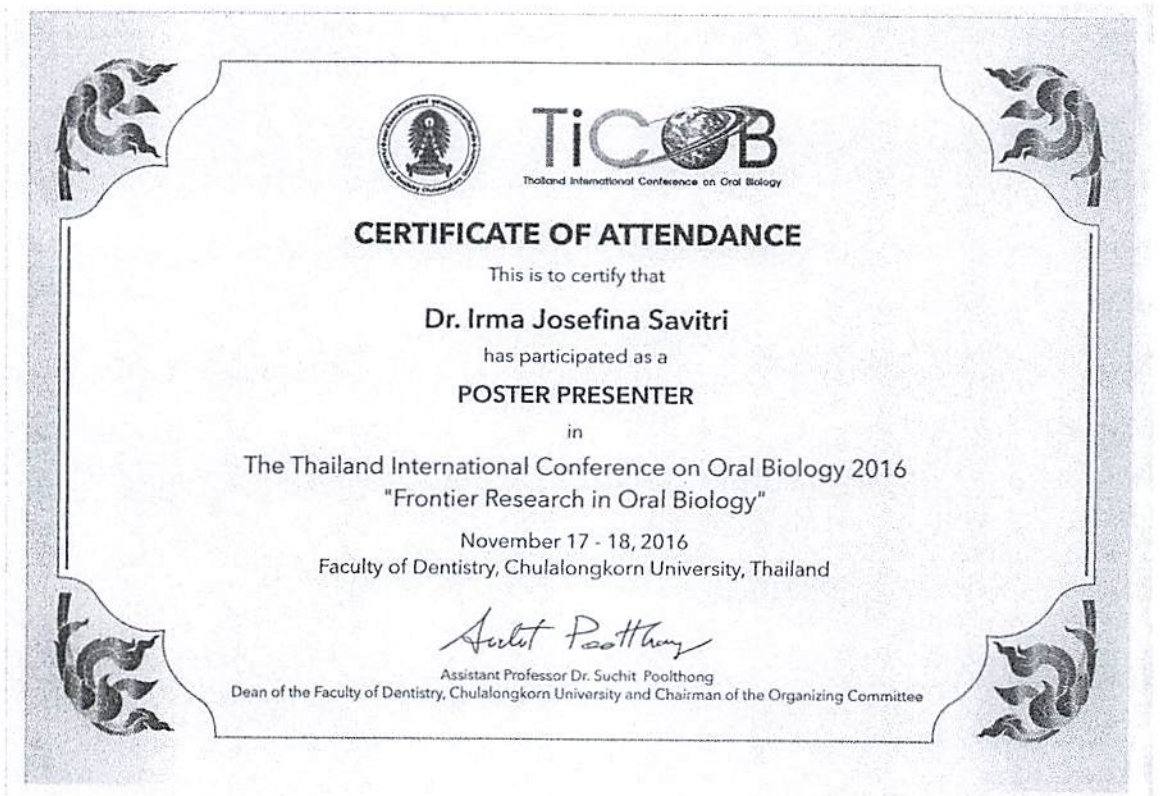
Valéria Gelani, Ana Paula Fernandes, Thais Helena Gasparoto, Thiago Pompermaier Garlet, Tânia Mary Cestari, Hayana Ramos Lima, et al. (2009) The Role of Toll-Like Receptor 2 in the Recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontol.* Dec;80(12):2010-9. December 2009, Vol. 80, No. 12, Pages 2010-2019.

Wang Q, Dziarski R, Kirschning CJ, Muzio M, Gupta D. (2001) Micrococci and peptidoglycan activate TLR2-->MyD88-->IRAK-->TRAF-->NIK-->IKK-->NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infect Immun.* Apr;69(4):2270-6.

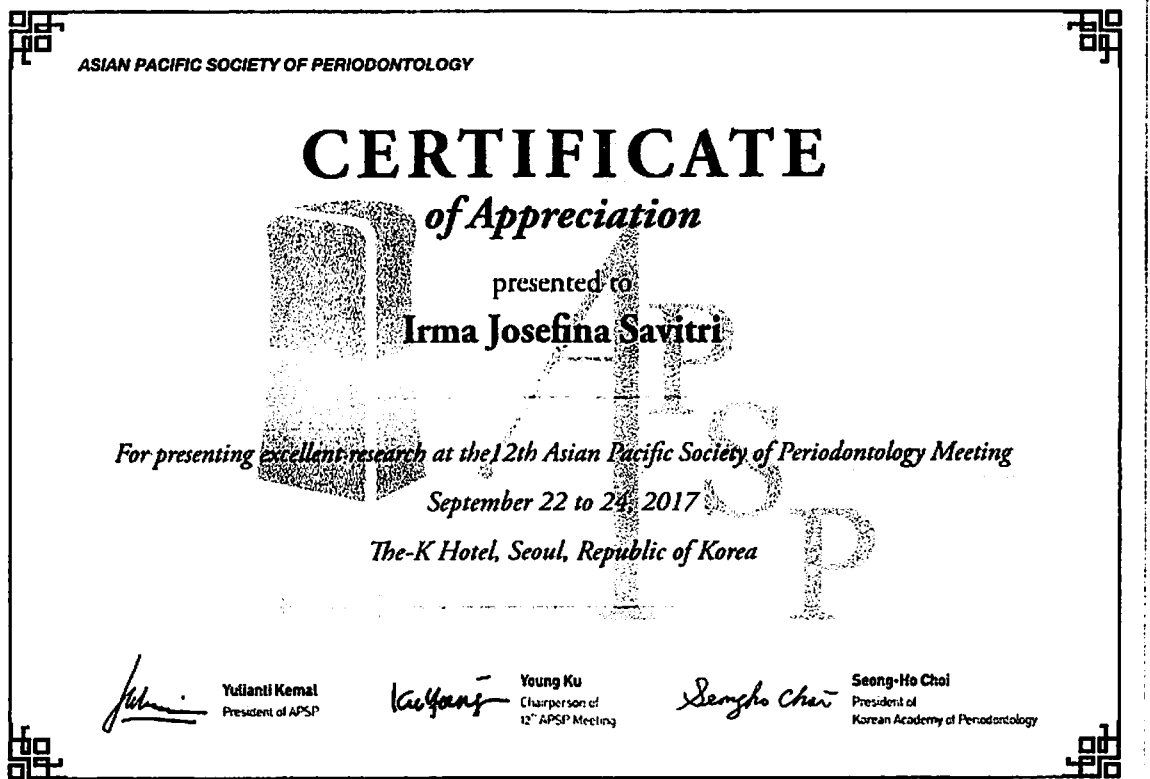
Yoshimura K, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y. (2002) Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Campylobacter jejuni* are antagonists for human toll-like receptor 4. *Infect Immun.* Jan;70(1):218-25.

Apendix

A. Certificat of poster presenter on Thailand International Conference on Oral Biology (TICOB) 2016



B. Sertificate of poster presenter on Asia Pacific society of Periodontology (Korea, September 2017)



C. Present paper in The 7th Hiroshima Conference (Hiroshima, Japan. Maret 2018)

7th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry
at Koujin Conference Hall, Kasumi Campus, Hiroshima University on
March 29-30, 2018

Certificate of Attendance and Presentation



Presents to

Dr. Irma Josefina Savitri

This is to certify that the above person has attended the conference and
successfully delivered her presentation based on her abstract.

Dr. Koichi Kato, Ph.D.

President of the Organizing Committee
7th Hiroshima Conference on Education and
Science in Dentistry
Dean, School of Dentistry
Professor and Chair, Department of Biomaterials
Graduate School of Biomedical & Health Sciences
Hiroshima University



Official Seal

Date: April 12, 2018

D. Draft Buku Ajar

Gingiva Sebagai Pertahanan Pertama Jaringan Periodontal

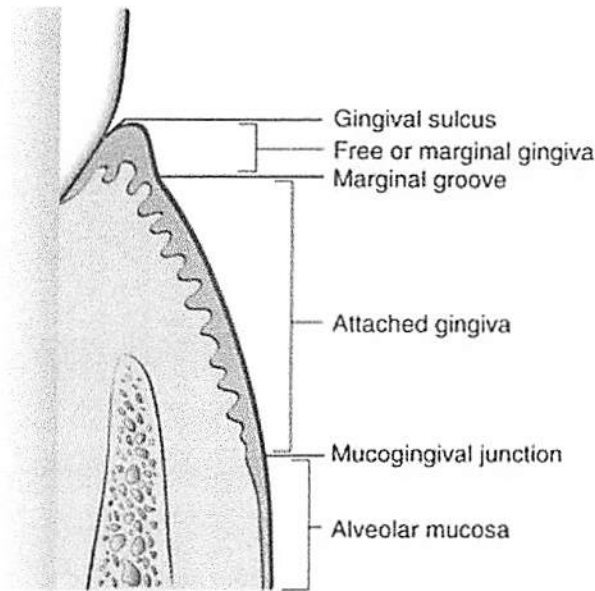
CHAPTER 1 Anatomi gingival

Mukosa oral terdiri dari tiga zona, antara lain:

1. Gingiva dan lapisan luar palatum durum, yang disebut dengan *masticatory mucosa*. Gingiva merupakan bagian dari mukosa oral yang melapisi prosesus alveolaris dari rahang atas dan rahang bawah serta mengelilingi leher gigi (Reddy,2017).
2. Dorsum lidah dilapisi oleh *specialized mucosa*
3. *Lining mucosa* yang merupakan membran mukosa oral yang melapisi bagian rongga mulut lainnya. (Carranza,2015)

1. Anatomi Gingiva Secara Makroskopik

Pada orang dewasa, gingiva normal berwarna *coral pink* yang melapisi tulang aveolar dan akar gigi sampai bagian coronal dari *cementoenamel junction*. Gingiva secara anatomis terbagi menjadi daerah marginal, attached, dan interdental. Setiap bagian gingiva menunjukkan variasi secara diferensiasi, histologi, dan ketebalannya, sesuai dengan kebutuhan serta fungsinya, semua tipe gingiva ini terbentuk secara khusus yang berfungsi melawan trauma mekanik dan mikrobial. Struktur spesifik setiap tipe gingiva menunjukkan efektifitasnya masing-masing sebagai barier terhadap penetrasi mikroba dan agent berbahaya lainnya, ke jaringan yang lebih dalam. (Carranza,2015)



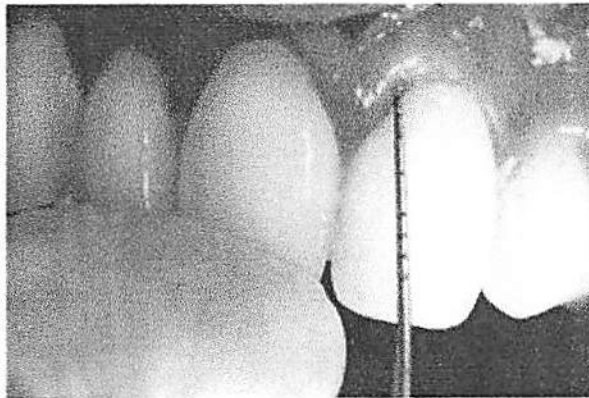
Gambar 1. Struktur anatomi gingival (Carranza,2015)

1.1.Marginal Gingiva

Marginal atau *unattached gingiva* atau *free gingival* merupakan ujung atau batas dari gingiva yang mengelilingi gigi seperti kerah baju (*collar-like fashion*). Kurang lebih 50% kasus, marginal gingiva dipisahkan dengan attached gingiva sebelahnya oleh garis cekungan dangkal yang disebut *free gingival groove*. Marginal gingiva biasanya memiliki lebar 1mm, dan membentuk dinding jaringan lunak dari sulkus gingiva. Marginal gingiva dapat dipisahkan dari permukaan gigi dengan periodontal probe. Titik paling puncak dari marginal gingival scallop disebut *gingival zenith*. Dimensi apicocoronal dan mesiodistal dari gingival zenith bervariasi antara 0.06 dan 0.96 mm.(Caranza,2015 ; Reddy,2017)

Sulkus gingiva merupakan cekungan atau celah dangkal disekeliling gigi yang dibatasi oleh permukaan gigi pada satu sisi dan epitel dari free gingiva pada sisi yang lain. sulkus gingiva memiliki bentuk *V-shaped*, dan dapat dilalui periodontal probe. Kedalaman klinis dari sulkus gingiva merupakan parameter penting dalam diagnosa. Pada keadaan normal sempurna atau kondisi ideal, kedalaman sulkus gingiva adalah 0 atau hampir 0. Kondisi normal yang benar- benar sempurna ini dapat dihasilkan secara ekperimental hanya pada hewan bebas kuman. (Caranza,2015 ; Reddy,2017)

Pada gingiva normal kedalaman sulcus secara histologi dilaporkan 1.8mm, dengan variasi dari 0 samai 6mm. penelitian yg lain menunjukkan kedalaman 1.5 mm dan 0.69 mm. Evaluasi klinis dilakukan dengan menggunakan instrumen metal (contohnya probe periodontal) dan estimasi kedalaman dari penetrasi instrumen tersebut (contohnya probing depth). Kedalaman histologis dari sulkus tidak harus sama dengan kedalaman probe yang masuk. Penetrasi probe tergantung dari beberapa faktor seperti diameter probe, kekuatan probing, dan level inflamasi. Akibatnya kedalaman probing tidak harus sama persis dengan kedalaman sulkus secara histologis. Probing depth pada gingiva normal secara klinis pada manusia adalah 2-3 mm. (Caranza,2015)



Gambar 2. Kedalaman sulcus pada gingival normal (Reddy, 2017)

1.2.Attached Gingiva

Attached gingiva bersambungan langsung dengan marginal gingiva. Attached gingiva sifatnya firm, resilient, dan berlekatan kuat dengan periosteum tulang alveolar di bawahnya. Aspek facial dari attached gingiva meluas hingga mukosa bergerak dari tulang alveolar. Attached gingiva berbatasan langsung dengan mucogingival junction. (Caranza,2015 ; Reddy,2017)

Lebar dari attached gingiva merupakan parameter klinis yang penting. Lebar attached gingiva merupakan jarak mucogingival junction dan proyeksi dasar dari sulkus gingiva atau periodontal pocket. Harus dibedakan lebar keratinized gingiva dan attached gingiva, karena keratinized gingiva juga meliputi marginal gingiva. (Caranza,2015)

Lebar attached gingiva dari aspek facial berbeda disetiap area rongga mulut. Pada umumnya daerah yang paling lebar ada di regio insisif (3.5 hingga 4.5 mm pada maxilla,

3.3 to 3.9 mm pada mandibula) lebih sempit pada daerah posterior (1.9 mm pada premolar pertama rahang atas dan 1.8 mm pada premolar pertama rahang bawah). Oleh karena tidak ada perubahan pada mucogingival junction pada orang dewasa, perubahan pada lebar attached gingiva lebih disebabkan oleh perubahan posisi pada bagian coronalnya. Lebar attached gingiva meningkat pada usia 4 tahun dan pada gigi supraposisi. Pada aspek lingual dari mandibula, attached gingiva berakhir pada mukosa lingual alveolar, yang berhubungan langsung dengan membran yang melapisi dasar mulut. Permukaan palatal dari attached gingiva pada maxila bersambungan langsung dengan mukosa palatal yang sifat firm dan resilient sama seperti attached gingiva sehingga sulit dibedakan. (Caranza,2015 ; Reddy,2017)

1.3. Interdental Gingiva

Interdental gingiva berada pada gingival embrasure, yang terletak, pada celah interproksimal di bawah kontak gigi. Interdental gingiva dapat berbentuk pyramdal atau berbentuk *col* (Reddy,2017). Bentuk dari gingiva pada daerah interdental tergantung pada ada tidaknya contact poin pada gigi-gigi yang bersebelahan, jarak antara contact point dan puncak tulang alveolar, serta ada tidaknya resesi. (Carranza,2015)

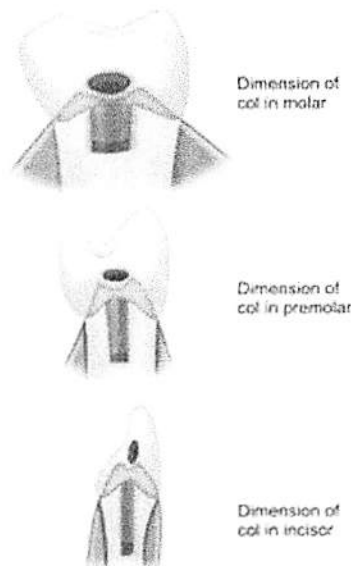


Fig. 2.5: Col in various types of contacts

Gambar 3. variasi bentuk col pada daerah interdental (Reddy,2017)

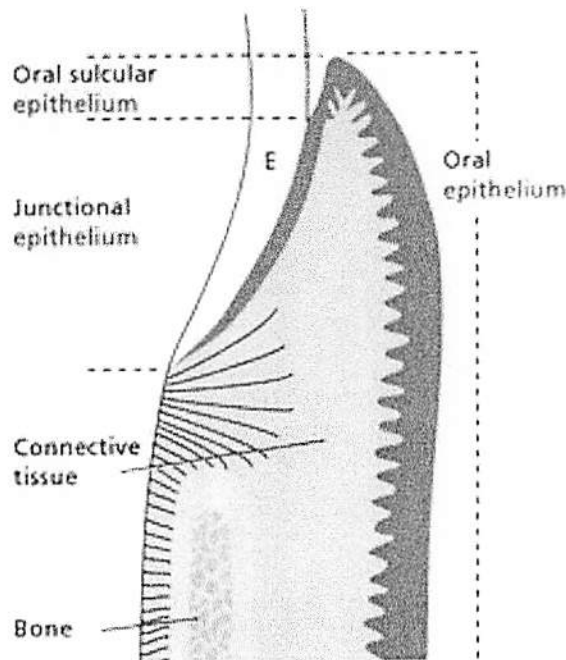
2. Anatomi Gingiva Secara Mikroskopik

Pemeriksaan mikroskopik menunjukkan bahwa gingiva tersusun dari *stratified squamous epithelium* dan jaringan ikat. Epitelium didominasi oleh komponen seluler, sedangkan jaringan ikat memiliki lebih sedikit komponen seluler, dan tersusun lebih banyak oleh serat-serat kolagen dan substansi dasar. (Caranza,2015 ; Reddy,2017)

2.1.Gingival Ephetelium

Awalnya bagian epitel pada gingival epithelium dianggap hanya memberikan perlindungan secara fisik terhadap bakteri dan bagian dari gingiva yang berada di bawahnya. Akan tetapi, sekarang diketahui bahwa sel-sel epitel berperan aktif dalam respon imun alami dan yang *acquired*. Contohnya, sel epitelial merespon bakteri dengan cara meningkatkan proliferasi, dan mengubah poses penghantaran sinyal, merubah diferensiasi dan kematian sel, dan terutama mempengaruhi proses homeostasis jaringan. (Caranza,2015)

Gingival epithelium tersusun oleh *stratified squamous epithelium*. Ada tiga area berbeda yang dapat dilihat dari sudut pandang morfologis dan fungsional: oral epithelium, sulcular epithelium, dan junctional epithelium. (Caranza,2015 ; Reddy,2017)



Gambar 4.Macam gingival epithelium (Niklaus,2015).

Stratified squamous epithelium yang menyusun gingival epithelium terdiri dari lapisan sel-sel berikut (Niklaus,2015):

1. *Basal layer* (stratum basale atau stratum germinativum)
2. *Prickle cell layer* (stratum spinosum)
3. *Granular cell layer* (stratum granulosum)
4. *Keratinized cell layer* (stratum corneum)

Sel utama yang menyusun gingival epithelium adalah keratinocyte. Sel lain yang ditemukan pada epithelium ada lah *clear cell* atau nonkeratinocytes, termasuk sel-sel Langerhans, dan sel-sel Merkel, dan melanocytes. (Niklaus,2015)

Fungsi utama dari gingival epithelium adalah melindungi struktur yang lebih dalam, sambil mengatur *selective interchange* dengan rongga mulut. Hal ini dapat tercapai dengan proliferasi dan diferensiasi dari keratinocytes. Proliferasi keratinocytes terjadi karena mitosis dari lapisan basal dan lapisan suprabasal (lebih jarang terjadi), dengan sebagian kecil dari sel yang berproliferasi sementara sejumlah besar sel mulai bermigrasi ke permukaan. (Carranza,2015)

Diferensiasi melibatkan proses keratinisasi, yang terdiri dari perkembangan biokimia dan bentuk yang terjadi pada sel saat mereka migrasi ke lapisan basal. Perubahan morfologis yang utama meliputi (Carranza,2015):

1. Pemipihan sel yang progresif disertai peningkatan prevalensi tonofilament
2. Berikatannya intercellular junction dengan hasil produksi dari keratohyalin granules
3. Dan hilangnya inti sel

Proses keratinisasi yang telah sempurna mengakibatkan terbentuknya lapisan tanduk orthokeratinized yang mirip seperti pada kulit, tanpa inti pada stratum corneum dan stratum granulosum yang tampak jelas. Hanya pada beberapa area lapisan luar gingiva yang dilapisi parakeratinized atau nonkeratinized epithelium dan disebut tahap intermediate dari proses keratinisasi. Area ini dapat berkembang menjadi matang atau berdiferensiasi pada kondisi fisiologis atau patologis yang berbeda. (Carranza,2015 ; Niklaus,2015)

2.1.1. Oral (Outer) Epithelium

Epitel luar rongga mulut meliputi crest dan permukaan luar dari marginal gingiva dan attached gingiva. Epitel ini berkeratin atau parakeratin, dan mungkin ditemukan berbagai variasi dari keadaan ini. Rata-rata ketebalan epitel rongga mulut antara 0,2- 0,3 mm. oral epitel terdiri dari 4 lapisan: stratum basalis, stratum spinosum, stratum granulosum, dan stratum corneum. (Caranza,2015 ; Reddy,2017)

2.1.2. Sulcular Epithelium

Sulcular epithelium melapisi sulkus gingiva memanjang dari margin gingiva hingga junctional epithelium. Epitel ini tipis, *stratified squamous epithelium* tanpa rete pegs, serta tidak berkeratin. Biasanya terlihat banyak sel dengan degenerasi *hidropic*. Meskipun demikian epitel pada sulkus ini mempunyai potensi berkeratin apabila terstimulasi secara fisik di rongga mulut. (Reddy,2017)

Sulcular epithelium terdiri dari 2 lapisan yaitu stratum basale dan stratum spinosum. Sulcular epithelium sangat penting, karena dapat berfungsi sebagai membran semipermeable yang dapat dilalui produk dari bakteri melewati gingiva dan juga dapat dilalui cairan gingiva menuju ke sulkus. Tidak seperti junctional epithelium, sulcular epithelium tidak diinfiltrasi secara banyak oleh polymorphonuclear neutrophil leukocytes, dan lebih tidak permeable. (Carranza,2015 ; Reddy,2017).

2.1.3. Junctional Epithelium

Junctional epithelium terletak mulai dari dasar sulcus, tersusun oleh epitel stratified squamous tidak berkeratin yang membentuk kumpulan seperti kerah. Junctional epithelium memiliki ketebalan bervariasi. Pada usia dini memiliki 3 hingga 4 lapisan, tetapi jumlahnya meningkat seiring bertambahnya usia menjadi 10 hingga 20 lapisan. Junctional epithelium berbentuk taper dari ujung koronalnya, dengan lebar 10 hingga 29 sel mengecil menjadi 1 sampai 2 sel pada daerah apikalnya, yang terletak pada cementoenamel junction pada jaringan sehat. Sel-sel ini dapat dikelompokkan menjadi dua stata: lapisan basal yang menghadap ke jaringan ikat dan lapisan suprabasal yang meluas

hingga permukaan gigi. Panjang dari junctional epithelium berkisar dari 0.25 sampai 1.35 mm. (Carranza,2015 ; Reddy,2017)

Junctional epithelium terbentuk dari gabungan epitel rongga mulut dan sisa epitel enamel saat erupsi gigi. Meskipun sisa epitel enamel bukan merupakan hal yang utama dalam pembentukan junctional epithelium; pada kenyataannya junctional epithelium terbentuk kembali secara sempurna setelah pocket instrumentation ataupun pada tindakan bedah, selain itu juga terbentuk disekitar implant. Junctional epithelium melekat pada permukaan gigi (*epithelial attachment*) melalui internal basal lamina. Dan melekat pada jaringan ikat gingiva oleh external basal lamina yang memiliki struktur yang sama seperti perlekatan epitel- jaringan ikat yang lain di tempat-tempat lain di tubuh.(Carranza,2015)

Internal basal lamina tersusun oleh lamina densa (bebas langsung dengan enamel) dan lamina lucida yang merupakan tempat melekatnya hemidesmosom. Hemidesmosom mempunyai peran penting dalam perlekatan sel ke internal basal lamina pada permukaan gigi. Data terbaru menunjukkan bahwa hemidesmosom kemungkinan juga berperan sebagai tempat spesifik terjadinya transduksi sinyal dan berperan dalam regulasi ekspresi gen, proliferasi sel, dan diferensiasi dari sel.(Carranza,2015)

Bukti histokimia keberadaan dari neutral polisakarida di daerah epithelial attachment telah ditemukan. Data juga menunjukkan bahwa lamina basalis dari junctional epithelium menyerupai sel endothelial dan epithelial dari laminin tetapi berbeda pada internal basal lamina, yang tidak memiliki kolagen tipe IV. Penemuan ini menunjukkan bahwa junctional epithelium memiliki peran dalam produksi laminin dan mempunyai peran penting dalam mekanisme perlekatan.(Carranza,2015)

Perlekatan junctional epithelium ke gigi diperkuat dengan serabut gingiva (*gingival fibers*) yang menahan margin gingiva ke permukaan gigi. Karena alasan ini, junctional epithelium dan serabut gingiva dikatakan sebagai satu unit fungsional yang disebut dentogingival unit. Kesimpulannya, junctional epithelium menunjukkan beberapa struktur unik dan sifat fungsional yang berperan dalam mencegah bakteri patogenik untuk berkolonisasi pada permukaan gigi subgingiva. Awalnya junctional epithelium melekat kuat pada permukaan gigi, selanjutnya membentuk pembatas epitel melawan bakteri plak setelah itu junctional epithelium dapat mengakses cairan gingiva, sel inflamatori, dan komponen pertahanan imun host ke gingival margin. Kemudian junctional epithelial cell

menunjukkan perubahan yang ekstrim, dimana berperan dalam keseimbangan host-parasit dan perkembangan jaringan yang rusak dengan cepat. Beberapa peneliti juga menunjukkan bahwa sel dari junctional epithelium memiliki kapasitas endositik setara dengan makrofag dan netrofil yang protektif alami.(Carranza,2015 ; Reddy,2017)

2.1.4. Cairan Gingiva (Gingival Fluid)

Cairan gingiva tersusun oleh kumpulan biochemical factor yang sangat beragam, oleh karena itu memberikan fungsi potensia sebagai biomarker diagnosa dan prognosa dari keadaan biologis periodonsium. Selain itu cairan gingiva tersusun oleh komponen jaringan ikat, epitel, sel inflamasi, seru, flora mikroba yang terdapat pada margin gingiva atau sulkus (pocket). Pada sulkus yang sehat, jumlah cairan gingiva sangat sedikit. Pada saat terjadi inflamasi jumlah cairan gingiva meningkat dan komposisinya mulai menyerupai eksudat inflamasi. Rute utama difusi cairan gingiva melalui dasar membran, menuju ruang intraseluler dari junctional epithelium, kemudian menuju sulkus. (Carranza,2015 ; Barros.,et all,2016).

Cairan gingival/ *gingival fluid* memiliki beberapa fungsi yaitu (Carranza,2015):

1. Membersihkan materi dari sulkus
2. Terdiri dari protein plasma yang dapat meningkatkan perlekatan epitel ke gigi
3. Memiliki fungsi antimikroba
4. Mengeluarkan antibodi untuk pertahanan gingiva

2.2. Jaringan ikat gingiva

Jaringan ikat gingival memiliki komponen terbanyak yaitu adalah serabut kolagen (60% volume), fibroblas (5%), pembuluh darah, saraf, dan matriks (sekitar 35%). Jaringan ikat gingiva dikenal pula sebagai lamina propria, dan terdiri dari 2 lapisan, yaitu

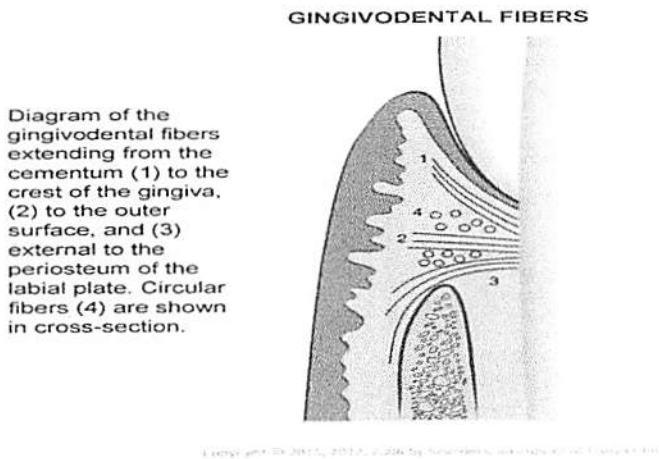
lapisan papillary dan lapisan retikuler. Lapisan papillary yang terletak di bawah epitel yang terdiri dari proyeksi papiler antara epitel rete pegs, dan lapisan retikular yang berdekatan dengan periosteum tulang alveolar. Jaringan ikat mempunyai bagian selular dan ekstraseluler yang tersusun atas serabut dan substansi dasar. Sehingga, jaringan ikat gingiva adalah jaringan ikat fibrous yang mempunyai elemen yang berasal langsung dari jaringan ikat mukosa oral dan beberapa serabut (*dentogingival*) yang berasal dari perkembangan folikel gigi. Substansi dasar mengisi celah antara fiber dan sel. Bersifat amorf dan memiliki kandungan air yang tinggi. Substansi ini terdiri dari proteoglikan (terutama hyaluronic acid dan chondroitin sulfate) dan glikoprotein (terutama fibronectin). Fibronectin mengikat fibroblas ke serabut – serabut dan banyak komponen lain dari matriks interseluler, dengan demikian membantu memediasi adesi sel dan migrasi. Laminin, yang merupakan glikoprotein yang ditemukan di basal lamina, membantu perlekatan ke sel epitel. Ada 3 macam serabut jaringan penyangga, yaitu, kolagen, retikuler, dan elastik. Kolagen tipe I membentuk sejumlah besar lamina propria dan memberikan kekuatan tarik pada jaringan ikat. Kolagen tipe IV (argyrophilic reticulum fiber) mempercabangkan antara ikatan kolagen tipe I, dan berkelanjutan dengan serabut dasar membran dan dinding pembuluh darah. Sistem serabut elastik terdiri dari oxytalan, elaunin, dan serabut elastin yang didistribusi antara serabut kolagen. Oleh karena itu, ikatan kolagen padat yang terikat pada acellular extrinsic fiber cementum tepat di bawah terminal point dari junctional epithelium membentuk perlekatan jaringan ikat. Stabilitas perlekatan ini merupakan faktor utama batasan migrasi junctional epithelium. (Carranza, 2015 ; Reddy, 2017)

2.2.1. Serabut gingiva (Gingival fibers)

Jaringan ikat pada marginal gingiva merupakan kolagen yang padat, terdiri dari sistem ikatan serabut kolagen yang disebut serabut gingiva. Serabut ini terdiri dari kolagen tipe I. serabut gingiva memiliki fungsi (Reddy, 2017):

1. Untuk menyangga margin gingiva ke gigi dengan kuat.
2. Menyediakan kekakuan yang dibutuhkan untuk menahan tekanan mastikasi tanpa dibelokkan menjauhi permukaan gigi.
3. Menyatukan free marginal gingiva dengan sementum akar dan attached gingiva yang berdekatan.

Serabut gingiva dibagi menjadi 3 kelompok : gingivodental, circular, dan transeptal. Serabut gingivodental berada pada permukaan fasial, lingual, dan interproksimal. Serabut ini tertanam pada sementum di bawah epitel yang berada di dasar sulkus gingiva. Pada permukaan fasial dan lingual, serabut gingiva ini keluar dari sementum ke crest dan permukaan luar marginal gingiva membentuk bentukan seperti kipas (*fan-like configuration*). Serabut ini, juga memanjang secara eksternal ke periosteum pada tulang alveolar fasial dan lingual, dan mengakhirinya pada attached gingiva atau menyatu dengan tulang periosteum. Pada interproksimal, serabut gingivodental memanjang menuju ke puncak interdental gingiva. (Carranza,2015 ; Niklaus,2015)



Gambar 5. Macam serabut gingival (Carranza,2015)

Circular fibers berjalan melalui jaringan ikat marginal dan gingiva interdental dan melingkari gigi seperti cincin (*ring-like fashion*). Transseptal fibers, yang terletak di interproksimal, membentuk ikatan horizontal yang memanjang antara sementum gigi ke bagian yang tertanam. Serabut ini terbentang pada daerah antara epitel dasar sulkus gingiva dan puncak tulang interdental, dimana terkadang diklasifikasi dengan serabut pokok ligamen periodontal. Page and colleagues mendeskripsikan kelompok serabut semicircular yang melekat pada permukaan proksimal gigi langsung di bawan cementoenamel junction, melingkari margin gingiva fasial atau lingual, dan melekat pada permukaan proksimal lain gigi yang sama, mereka juga mendiskusikan sekelompok

serabut transgingival yang melekat pada permukaan proksimal 1 gigi, menyeberangi celah interdental secara melintang, melingkari permukaan fasial atau lingual gigi yang berdekatan, lalu melekat pada permukaan proksimal gigi selanjutnya. Tekanan tractional matriks ekstraseluler diproduksi oleh fibroblas dan dikatakan bertanggung jawab menghasilkan tegangan pada kolagen. Hal ini membuat gigi berikatan erat satu sama lain dan dengan tulang alveolar. (Carranza,2015 ; Niklaus,2015)

2.2.2. Elemen seluler

Elemen seluler pada jaringan ikat gingival meliputi fibroblast, sel mast, serta komponen lain derivat dari darah. Elemen seluler yang lebih besar pada jaringan ikat gingiva adalah fibroblas. Sejumlah fibroblas ditemukan berada di antara ikatan serabut. Fibroblas berasal dari mesenkimal dan berperan penting dalam perkembangan, perawatan, dan perbaikan jaringan ikat gingiva. Seperti jaringan ikat pada bagian tubuh lain, fibroblas mensintesis kolagen, serabut elastik, glikoprotein dan glikosaminoglikan dari bahan amorf interselular. Glukosaminoglikan memiliki peran penting dalam regulasi migrasi sel dalam jaringan. Fibroblas juga meregulasi degradasi kolagen melalui fagositosis dan sekresi kolagenase. Heterogenitas kolagen merupakan unsur penting fibroblas di periodontal. Meskipun, kepentingan biologis dan klinis dari heterogenitas ini masih belum jelas, tampaknya merupakan faktor yang diperlukan dalam fungsional jaringan kesehatan, sakit, dan perbaikan. (Carranza,2015 ; Reddy,2017)

Jaringan ikat mukosa oral dan gingiva terdapat banyak *Mast cells*. Makrofag dan histiosit terdapat pada jaringan ikat gingiva sebagai komponen *mononuclear phagocyte system (reticuloendothelial system)* dan derivat dari monosit darah. Pada gingiva normal, sel plasma dan limfosit sedikit ditemukan pada jaringan ikat yang berada dekat dengan sulkus. Namun ditemukan Netrofil dalam jumlah yang relatif tinggi pada jaringan ikat gingiva dan sulkus. Sel inflamatori ini biasanya terdapat dalam jumlah yang kecil pada gingiva normal.(Carranza,2015 ; Niklaus,2015).

Perbaikan jaringan ikat gingiva merupakan salah satu jaringan yang penyembuhannya paling baik di tubuh, dan menunjukkan sedikit bekas luka pada prosedur bedah. Hal ini dikarenakan rekonstruksi yang cepat dari fibrous jaringan.

Namun, kapasitas reparasi jaringan ikat tidak sebaik ligamen periodontal atau jaringan epitel. (Carranza,2015)

2.2.3. Suplai darah, limfatik, dan saraf

Sistem mikrosirkulasi, pembuluh darah, dan pembuluh limfa memegang peranan penting dalam mendrainase cairan gingiva dan penyebaran inflamasi. Pada pasien dengan gingivitis dan periodontitis, mikrosirkulasi dan pembentukan vaskuler berubah sangat besar pada jaringan vaskuler langsung di bawah epitel sulcular gingiva dan junctional epithelium(Carranza,2015). Tiga sumber suplai darah ke gingiva adalah (Carranza,2015 ; Reddy,2017):

1. *supraperiosteal arterioles*

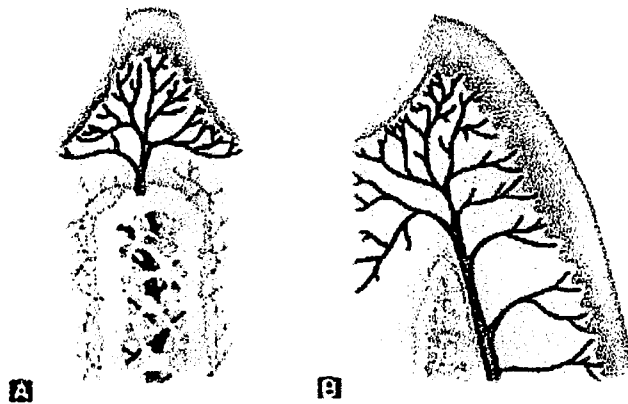
Supraperiosteal arterioles sepanjang permukaan fasial dan lingual tulang alveolar yang pembuluh kapilernya memanjang sepanjang epitel sulkular dan di antara rete pegs permukaan gingival eksternal. *Supraperiosteal arterioles* memiliki cabang terminal yaitu arteri sublingual, mental, facial, bukal, greater palatine, arteri infraorbital, arteri alveolaris superior-posterior dan berakhir pada pembuluh kapiler sepanjang epithelium.

2. Pembuluh darah ligamen periodontal

Pembuluh darah ligamen periodontal memanjang ke dalam gingiva dan beranastomose dengan kapiler pada area sulkus.

3. *Arterioles*

Arterioles yang muncul pada puncak septum interdental dan memanjang paralel ke puncak tulang untuk beranastomose dengan pembuluh darah ligamen periodontal, dengan kapiler berada pada area gingival crevicular dan pembuluh darah yang berjalan melewati puncak alveolar. Di bawah epitel pada permukaan gingiva luar, kapiler memanjang ke papiler jaringan ikat antara epithelial rete pegs.



Figs 2.14A and B: Blood supply to gingiva. (A) Arteries penetrating the interdental bone. (B) Venous postcapillary arterioles

Gambar 6. Suplai darah pada gingival (Reddy,2017)

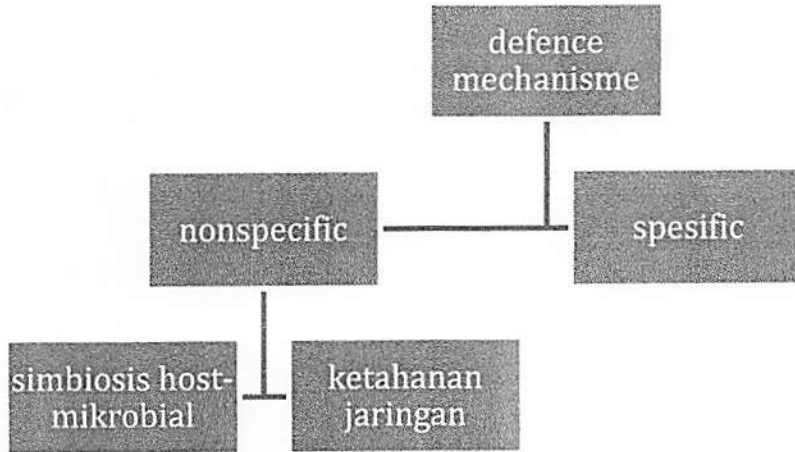
Peran sistem limfa pada gingival adalah membuang sisa cairan, seluler dan debris protein, mikroorganisme, dan elemen lain penting dalam mengontrol difusi dan proses inflamasi. Drainase limfa gingiva menghasilkan limfatik papila jaringan ikat, berkembang mengumpulkan jaringan eksternal ke periosteum prosesus alveolaris lalu bergerak ke simpul limfa regional, terutama kelompok submaxillary. (Carranza,2015 ; Reddy,2017)

Inervasi saraf pada gingival, reseptor berupa free endings terdapat pada lapisan papillary di lamina propia. Elemen neural didistribusi banyak melalui jaringan gingiva. Dalam jaringan ikat gingiva, sebagian besar serabut saraf bermielin dan berikatan dekat dengan pembuluh darah. Inervasi gingiva berasal dari serabut yang muncul dari saraf ligamen periodontal dan dari saraf labial, bukal, dan palatal. (Reddy,2017)

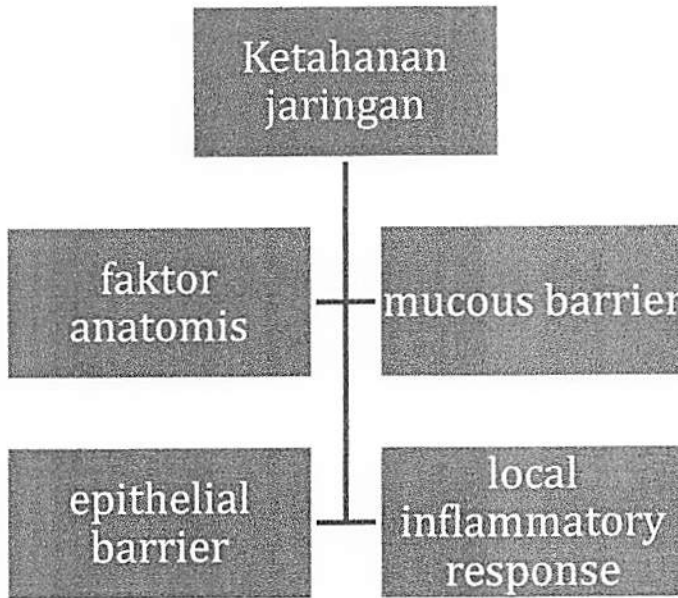
3. Keberadaan Gingiva di dalam Jaringan Periodontal

Gingiva memiliki peran di dalam jaringan periodontal sebagai system pertahanan yang dibagi menjadi imunitas spesifik dan non spesifik. Imunitas non spesifik meliputi innate immunity dan sebagai pertahanan pertama terhadap periopatogen. Semua infeksi tidak dapat dieliminasi dengan innate immunity karena mikroorganisme bermutasi dengan cepat. Untuk

menghentikan perubahan ini, mekanisme pertahanan spesifik yaitu adaptive immunity dapat membedakan self dan non self. Ketahanan jaringan memiliki 4 barier yaitu faktor anatomis, mucous barrier, epithelial barrier, local inflammatory barrier. Penembusan dari salah satu faktor itu dapat menyebabkan penyakit (Verma,2014)



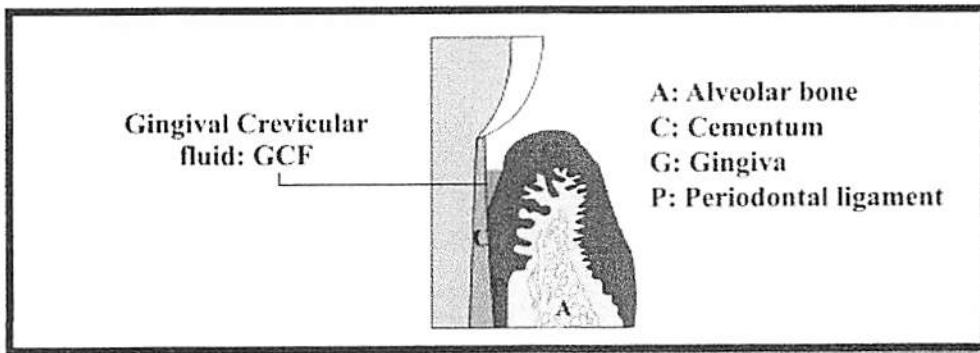
Gambar 7. Klasifikasi mekanisme pertahanan gingival (Verma,2014)



Gambar 8. Ketahanan jaringan (Verma,2014)

3.1 Cairan GCF (Gingival Crevicular Fluid)

Keberadaan cairan yang terdapat pada gingival ini merupakan hal terpenting di dalam jaringan periodontal. Cairan krevikular gingiva (GCF) mengandung protein, populasi sel yang beragam, sel epitel terdeskuamasi, dan bakteri dari plak yang berdekatan. (Carranza,2015). GCF merupakan sebuah cairan fisiologis yang dikategorikan sebagai eksudat inflamasi oleh berbagai peneliti, dan beberapa menyatakan bahwa GCF merupakan transudat jaringan yang berubah pada keadaan sehat normal. Semula, GCF berasal dari pleksus gingival dari pembuluh darah pada corium gingiva dan terletak dibawah lapisan epitelium dari rongga dental-gingiva.(Barros.,et all,2016)



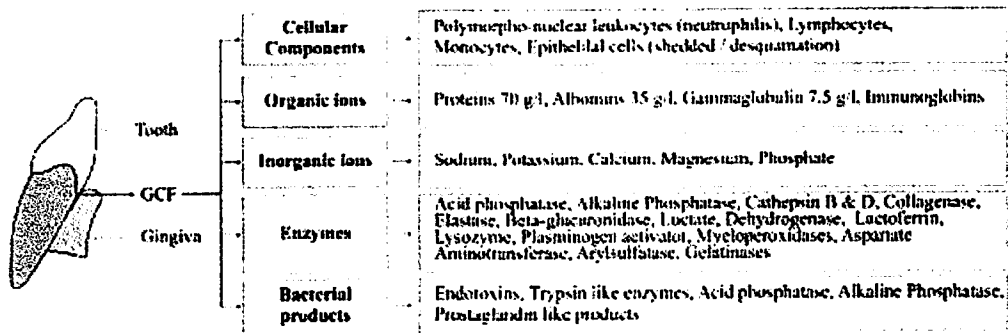
Gambar 9. Lokasi anatomis dari cairan krevikular gingiva (GCF) pada kondisi normal(Zohaib.,et all,2017)

GCF digunakan untuk mendeteksi penyakit periodontal antara lain gingivitis, periodontitis (kronis dan agresif), dan adanya obat pada poket periodontal melalui jalur sistematis dan saat ini sangat sering digunakan untuk analisa proteomik . Alat proteomik telah merevolusi karakterisasi dari protein dan peptida dan deteksi dari perubahan penyakit awal pada tubuh manusia. Cairan krevikular gingiva (GCF) merupakan cairan kavitas oral yang sangat spesifik yang mewakili kesehatan periodontal. (Zohaib.,et all,2017)

Ilmu proteomik membantu dalam daerah yang berbeda-beda dari ilmu biomedis dan klinis dengan alat seperti poliakrilamid gel elektroforesis (PAGE), kromatografi cairan tekanan tinggi (HPLC), spektrometri massa (MS), ionisasi desorpsi laser dibantu matriks (MALDI), dan desorpsi laser yang ditingkatkan permukaannya/spektrometri ionisasi massa (SELDI-MS) . Ilmu ini menyediakan pengertian mengenai keadaan sehat dan sakit dari tubuh manusia melalui sifat protein. Protein membangun tubuh manusia dan dikenal sebagai “tenaga kerja” dari sel. ‘Proteom’ merupakan isi dari protein sel.

Proteom adalah penemuan teknologi yang menolong pengertian dari sifat molekuler dari aktivitas protein dan bagaimana protein merespon terhadap proses penyakit. Cairan tubuh manusia seperti darah, cairan serebrospinal (CSF), saliva, cairan krevikular gingiva (GCF), sera, urin, sekresi vaginal, ASI, sputum, cairan peritoneal, cairan pleural, dan cairan perikardial merupakan sampel klinis yang diakui untuk diagnosa dan penanganan dari sebuah status penyakit. (Zohaib.,et all 2017)

GCF mengandung pemecahan produk lokal seperti jaringan, mediator inflamasi, mediator inflamasi *host*, transudat serum (ditemukan pada sulkus gingiva), plak mikroba subgingiva, protein ekstraseluler, dan sel. Pada Gambar 2, terdapat rincian dari komposisi GCF. Komposisi ini beragam antar periodonsium pada kondisi yang sehat dan yang berpenyakit . Jumlah produksi GCF cukup kecil dan bervariasi menurut ukuran dari sulkus gingiva. (Barros.,et all,2016)



Gambar 10. Ilustrasi yang menjelaskan komposisi dari cairan krevikular gingiva (GCF) (Zohaib.,et all 2017)

Beberapa eksperimen dilakukan dan disimpulkan terdapat peningkatan pH yang besar dari sulkus gingiva pada saat periodontitis berkembang, tercatat sekitar 8.5. Peningkatan pH dikaitkan dengan protein yang dirusak oleh bakteri di dalam sulkus. Amonia yang merupakan dasar alamiah diproduksi sebagai produk sampingan setelah degradasi dari protein dan diperkirakan menjadi alasan peningkatan pH pada sulkus krevikular. (Barros.,et all,2016)

Tabel 1. Penjelasan dari faktor-faktor yang mempengaruhi jumlah GCF pada kavitas oral manusia(Zohaib.,et all 2017)

Faktor	Penjelasan
Mekanis	Mengunyah makanan yang kasar, menyikat gigi secara bertenaga dan pijat gingiva diketahui untuk meningkatkan produksi GCF
Periodisitas Sirkadian	Jumlah GCF meningkat secara perlahan dari jam 6 pagi hingga 10 malam dan menurun setelahnya
Pembedahan Periodontal	Produksi GCF meningkat setelah pembedahan periodontal, pada saat periode penyembuhan
Merokok	Merokok meningkatkan aliran GCF. Peningkatan ini bersifat langsung dan sementara

GCF tidak hanya dapat menjadi alat diagnosa di masa depan untuk identifikasi dari periodontitis tetapi juga dapat membantu dalam mendeteksi progresi dari penyakit ini. Deteksi awal dari progresi periodontitis dapat berguna secara klinis dengan menyediakan kontrol aktivitas penyakit yang lebih baik dan dapat meningkatkan monitor pasien. Oleh karena itu, mengambil GCF dari berbagai tempat dapat membantu dalam mengidentifikasi suseptibilitas yang tinggi terhadap aktivitas penyakit pada tempat-tempat tersebut, tempat beresiko yang ditarget dapat dikendalikan dengan benar, dan progresi yang berkelanjutan dari penyakit dapat dikontrol .(Kinney.,et all,2014)

DAFTAR PUSTAKA

Barros, S.P.; Williams, R.; Offenbacher, S.; Morelli, T. *Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis*. *Periodontol.* 2000 2016, 70, 53–64

Carranza.2015.*Carranza's Clinical Periodontology*. 12th edition.Elsevier. hal. 9-19

Kinney, J.S.; Morelli, T.; Oh, M.; Braun, T.M.; Ramseier, C.A.; Sugai, J.V.; Giannobile, W.V. *Crevicular fluid biomarkers and periodontal disease progression*. *J. Clin. Periodontol.* 2014, 41, 113–120

Niklaus P. Lang, Jan Lindhe. 2015. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 6th edition. Wiley. Hal.8-22

Reddy, Shantipriya. 2017. *Essentials of Clinical Periodontology & Periodontics*. 5th Edition. Jaypee. hal 8-20

Verma E., Jhavar A., 2014. *Defense Mechanism of Gingiva*. J Orofac Res 2014;4(2): 111-114

Zohaib K., Maria M., Mustafa N., Shariq N., Muhammad S. *gcf proteomics.dentistry journal*. MDPI 2017

Chapter 2 Mekanisme Pertahanan Gingiva

1. Struktur Epitel

Secara mikroskopis, *gingiva* tersusun oleh lapisan *epithelium stratificatum squamosum* dan pada bagian tengah berupa jaringan ikat yang dinamakan dengan lamina propria. Fungsi utama epitel *gingiva* ialah untuk melindungi struktur yang berada dibawahnya, serta memungkinkan terjadinya perubahan selektif dengan lingkungan oral yang dapat terjadi oleh adanya proses proliferasi dan diferensiasi. Epitel *gingiva* berasal dari jaringan *ectodermal* yang berdasarkan pada morfologi dan fungsionalnya dapat dibedakan menjadi:

a. *Junctional epithelium* (JE)

Junctional epithelium membentuk perlekatan antara *gingiva* dengan permukaan gigi. Jenis epitel ini ialah *epithelium stratifikatum squamosum non-keratinized*. *Junctional epithelium* akan melekat pada gigi dengan bantuan lamina basal. Perlekatannya ke permukaan gigi diperkuat pula oleh serat-serat *gingiva* yang mendukung *gingiva* bebas ke permukaan gigi, oleh sebab itu, *junctional epithelium* dan serat-serat *gingiva* dianggap sebagai unit fungsional yang disebut unit dentogingiva.

Terdiri dari berkas epitel berlapis pipih yang tidak berkeratin dan tersusun seperti kerah. Pada awal terbentuk, tebalnya antara 3-4 lapisan, namun terus bertambah seiring bertambahnya umur sampai 10-20 lapisan. Bentuknya meruncing dari ujung koronal ke apikalnya, yang terletak di CEJ pada kondisi normal / sehat. Lapisan JE dapat dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu internal basal lamina (IBL) yang menghadap ke permukaan gigi dan external basal lamina yang menghadap ke jaringan ikat. JE dibagi menjadi 3 zona yaitu daerah koronal, tengah dan apikal. Daerah tengahnya merupakan daerah dengan perlekatan maksimum, sedangkan daerah koronal merupakan daerah yang lebih permeabel. JE membentuk perlekatan epitel antara gigi dengan *gingiva* melalui perlekatannya dengan lapisan internal basal lamina JE dan hemidesmosome. Internal basal lamina terdiri dari lamina densa (LD) dan lamina lucida (LL). Lamina densa merupakan bagian dari IBL yang dekat dengan permukaan gigi. Setiap sel dari JE membentuk hemidesmosome untuk membentuk perlekatan antara *gingiva* dengan permukaan gigi.

Junctional epithelium merupakan bagian dari tepi *free gingiva*, terbentuk dari *collar ptheriperal* ke bagian servikal gigi, dan tidak terlihat secara intra oral. Pada area *interproximal*, *junctional epithelium adjacent* dengan gigi tetangga untuk membentuk garis tepi epithelial dari interdental. Bagian perbatasan koronal dari *junctional epithelium* adalah permukaan yang bebas dan lokasinya pada bawah sulkus, pada *margin gingiva*, atau pada interdental col area. Di bawah kondisi (pristine), penutup epithelial meluas dari cement-enamel junction ke *margin gingiva*, dengan tinggi rata-rata 2 mm. (Carranza, 2014)

b. *Oral epithelium*

Jenis epitel yang terdapat pada *gingiva* cekat dan *gingiva* tepi adalah *epithelium stratifikatum squamosum keratinized*. Meluas dari batas mukogingiva ke krista tepi *gingiva* (*crest gingiva margin*), kecuali pada permukaan palatal dimana tepi epitel ini menyatu dengan epitel palatum. Lamina basal yang menyatukan epitel *gingiva* ke jaringan ikat *gingiva* bersifat permeable terhadap cairan, namun dapat menjadi penghalang bagi bahan partikel tertentu. Pada *oral gingiva epithelium* memiliki *retepeg* yang menonjol ke arah lamina propria. (Schroeder, 1969)

Oral epithelium dapat dibagi kedalam beberapa lapisan sel yaitu:

- Basal layer (Stratum Basal)
- Prickle cell layer (Stratum Spinosum)
- Granular cell layer (Stratum Granulosum)
- Keratinized cell layer (Stratum Korneum)

Bagian ini menutupi bagian puncak dan bagian permukaan luar dari margin *gingiva* dan attached *gingiva*. Rata-rata ketebalan epithelium oral adalah 0,2-0,3 mm. Strukturnya berkeratin atau parakeratin, dimana secara umum permukaannya bersifat parakeratin. Epithelium oral tersusun dari 4 lapisan, yaitu stratum korneum, granulosum, spinosum, dan basal. Perubahan sel dari tiap lapisan ke lapisan lainnya meliputi :

- (1) penipisan / perataan sel serta diikuti peningkatan jumlah tonofilamen,
- (2) pembentukan *intercellular junction* dengan membentuk keratohyalin granules, dan
- (3) menghilangnya nukleus sel.

c. Oral sulcular

Epithelium oral sulcular melindungi sulkus *gingiva* dan menghadap ke permukaan gigi tanpa melekat padanya. Jenis epitel ini merupakan *epithelium stratifikatum squamosum non-keratinized* yang berlapis tipis, tidak berkeratin, tanpa *retepeg* dan perluasannya mulai dari batas koronal *junctional epithelium* sampai ke krista tepi *gingiva*. Karena bersifat *semipermeable*, epitel ini dapat ditembus oleh produk bakteri yang masuk kedalam *gingiva* dan cairan *gingiva* yang keluar dari sulkus *gingiva*. Oral sulcular merupakan lapisan epitel yang menutupi sulkus *gingiva*. Tersusun dari epitel berlapis pipih yang tidak

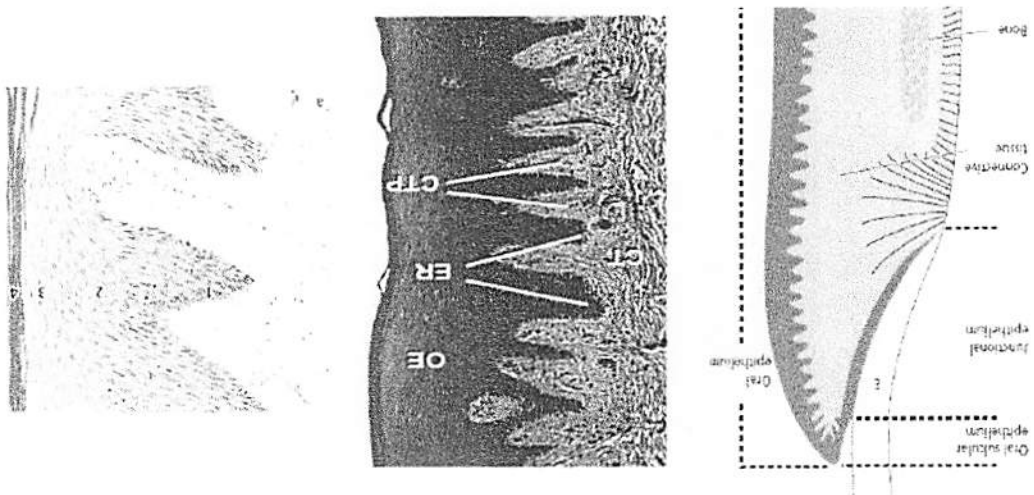
Basement membran adalah extraselular matrix yang khusus yang berada di antara jaringan ikat dan epitel, endotel, serat otot, dan sistem saraf. Komponen ini berperan dalam kompartemental sebagai fisikal barrier, filtrasi (fungsi permeabilitas), polarisasi sel, migrasi, adhesi, dan diferensiasi. Terdiri dari lamina lucida (biasa dikenal juga dengan sebutan lamina rara), lamina densa dan lamina fibroreticularis (sub-basal lamina). Bentuk berikutnya dari layer yang terpusat terdiri dari reticular dan fibril terjagkar dan jaringan ikat dari bentuk asalnya. Tipe *matrix* dari *basement membran* ialah kolagen tipe IV dan VII, laminin, heparin sulfat proteoglycan, fibronectin, nidogen dan proteoglycan

Junctional epithelium, basal lamina berlanjut dengan *basement membran*. Jaringan ikat gingiva, basal lamina terbentuk dari *interfacial matrix* antara gigi dengan sel eksternal basal lamina, (interposed) di antara sel basal dari *junctional epithelium* dan gingiva) dan permukaan gigi. Sedangkan *basement membran* terkadang beralih sebagai *junctional epithelium* berhadapan dengan jaringan ikat gingiva (lamina propria dari

Perlekatan Epitelial

gingiva

Gambar 1. a. Ilustrasi potongan gingiva b. Histologis gingiva c. Lapisan



epithelium sampai ke puncak *marginal gingiva*. (Chatterjee, 2006) berkeratin dan tidak memiliki *rete peg*, yang memanjang dari bagian koronal *junctional*

perlecan. Sedangkan eksternal basement membran dari junctional epitelium mirip secara struktur dan karakteristik molecular. Namun sangat kurang dalam komponen seperti kolagen tipe IV dan VII, kebanyakan laminin isoforms, perlecan, dan lamina fibroreticularis. (Dieter, 2005)

2. Epitel sebagai *innate immunity*

Penyakit periodontal adalah infeksi bakteri kronis yang mempengaruhi gingiva dan tulang yang mendukung gigi. Penyakit radang kronis ini berasal dari respon terhadap bakteri dalam biofilm gigi dan mungkin tetap terbatas pada jaringan gingiva dengan perubahan jaringan minimal atau penyakit ini dapat berlanjut ke penghancuran periodontal yang ekstrem dengan hilangnya tulang lampiran dan alveolar. Selain adanya periodontopatogen seperti *Porphyromonas gingivais*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan *Tannerella forsythia*, faktor genetik dan lingkungan tampaknya meningkatkan kerentanan beberapa individu dalam mengembangkan penyakit peradangan parah ini. (Mariano, 2010)

Sel mukosa oral seperti sel epitel berperan sebagai *barrier* fisik melawan invasi organisme patogen. Selain itu, oral (gingiva) epithelial cells pada daerah yang mengalami peradangan tampak mengekspresikan beberapa sitokin pro-inflamasi (seperti IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF-1), dan molekul-molekul adhesi (Sugawara, 2002). Pertahanan epitel terdiri dari pertahanan secara fisik, kimia dan imunologik (Ji Suk, 2013).

Pertahanan secara fisik dibentuk dari kesatuan struktural yang unik dari epitel stratified gingiva, dimana sel epithelial bergabung dalam relasi struktur *junctional* yang kuat dan *adhering junction*. Histologi mukosa rongga mulut terdiri dari epitel berlapis pipih berkeratin, tidak berkeratin, atau parakeratin dengan jaringan ikat di bawahnya. Bagian rongga mulut yang terkena gesekan (gingiva, permukaan dorsal lidah, dan palatum durum) dilapisi oleh *masticatory mucosa* yang terdiri dari epitel berlapis pipih parakeratin dan epitel berlapis pipih berkeratin dengan jaringan ikat padat (kolagen) yang tidak teratur di dasarnya. Bagian rongga mulut lainnya dilapisi oleh *lining mucosa* dengan epitel berlapis pipih tidak berkeratin dan juga terdapat jaringan ikat padat (kolagen) yang tidak teratur. Selain itu, terdapat juga jenis mukosa rongga mulut yang

mengandung kuncup kecap yang terdapat pada permukaan dorsal lidah yaitu *specialized mucosa* (Gartner, 2007).

Pertahanan secara kimia terutama dibentuk oleh berbagai peptida antimikroba (AMPs) (Dale dan Fredericks 2005). AMPs, yang disebut sebagai antibiotik yang diproduksi secara endogen, adalah peptida kationik dengan struktur amphipatik, yang memiliki spektrum aktivitas antimikroba yang luas. Sehingga, berkontribusi untuk mengendalikan jumlah bakteri pada sulkus gingiva (Dale dan Fredericks 2005; Brown and Hancock 2006).

AMPs berfungsi dengan berasosiasi dengan struktur mikroba anionik, dan kemudian menyatu membentuk pori-pori di membran mikroba (Marshall, 2004). *Defensin* dan *cathelicidin* merupakan AMPs utama yang terdeteksi di rongga mulut. *Defensin* dibagi menjadi dua famili, α -*defensin* (peptida neutrofil manusia) yang pada dasarnya ditemukan pada neutrofil dan *human β -defensin* (HBDs) yang umumnya ditemukan terkait dengan epitel oral (Chung, et al. 2007). LL-37, satu-satunya anggota manusia yang tergabung dalam keluarga *cathelicidin*, diproduksi oleh sel epitel dan neutrofil (Chung et al. 2007). Kurangnya jumlah LL-37 pada saliva dan neutrofil yang diamati pada pasien dengan *Kostmann syndrome* yang mengalami *periodontitis severe* pada masa dewasa muda menggarisbawahi pentingnya pertahanan kimia (Defraia and Marinelli, 2001; Pütsep et al. 2002).

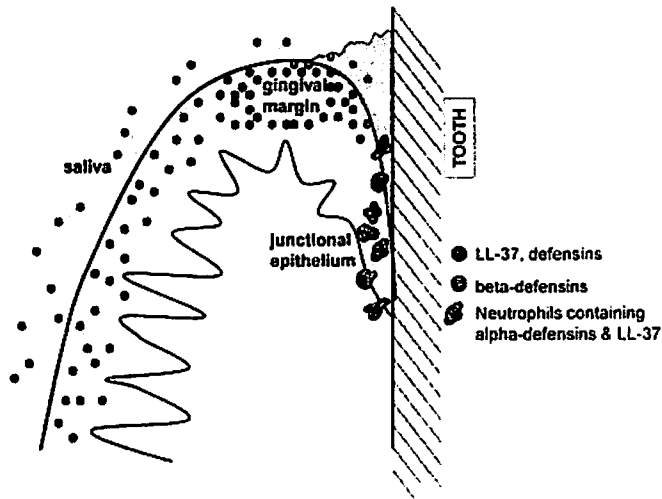
Dengan adanya beragam lingkungan mikroba, epitel mengekspresikan beberapa peptida antimikroba alami (AMPs) yang bekerja secara sinergis dengan spektrum luas dengan aktivitas melawan bakteri gram negatif dan gram positif, serta melawan jamur dan beberapa virus untuk menjaga keseimbangan antara sehat dan sakit. (Hancock and Chapple 1999; Lehrer and Ganz 2002; Premratanachai, Joly et al. 2004).

AMP adalah peptida kationik kecil dengan berat molekul berkisar antara 3.500 dan 6.500 Da (Dale 2002). AMP mengadopsi topologi amphiphilic, yang memungkinkan untuk berinteraksi dan menghancurkan membran sel mikroba secara selektif (Som, Vemparala et al 2008). Pada manusia, peptida antimikroba ini meliputi *defensin* dan family *cathelicidin* LL-37 pada mukosa kulit dan mulut, serta epitel lainnya (Hancock dan Scott 2000; Lehrer dan Ganz 2002; Selsted dan Ouellette 2005).

Defensin pada manusia meliputi *alpha-defensins* terletak pada usus dan neutrofil, *beta-defensin* dapat dijumpai pada kulit dan mukosa oral, serta epitel lainnya. *Alpha-defensin* diekspresikan pada neutrofil sebagai bagian dari mekanisme antimikroba non-oksidatifnya (Lehrer, Lichtenstein et al 1993; van Wetering, Sterk et al, 1999). *Alpha-defensin* juga ditemukan di sel Paneth di usus yang disintesis sebagai prekursor yang aktif secara proteolitik dan dilepaskan selama peradangan (Selsted 1992; Ouellette 1999; Rock 1998; Wilson, Ouellette et al, 1999).

Beta defensin pada manusia (hBDs) adalah peptida antimikroba kationik kecil yang disintesa terutama oleh sel epitel dan diekspresikan dalam semua epithelia manusia yang diuji sampai saat ini (Dale 2002). *Beta-defensin* disekresikan pada cairan biologis termasuk urin, cairan bronkial, sekresi hidung, saliva dan cairan *gingiva* krevikular (Valore, Park et al 1998; Cole 1999; Sahasrabudhe 2000; Diamond, Kimball dkk. 2001). hBD pertama kali diidentifikasi pada sel epitel trakea dan kemudian ditemukan di banyak epithelia termasuk ginjal dan saluran kemih, mukosa mulut dan kulit (Diamond, Russell et al 1996; Zhao, Wang et al 1996; Krisanaprakornkit, Weinberg dkk. 1998; Valore, Park et al. 1998).

Pengeluaran *cathelicidin*, LL-37, ditemukan pada lidah manusia, mukosa bukal dan saliva mengikuti stimulasi inflamasi (Frohm Nilsson, Sandstedt et al, 1999; Murakami, Ohtake dkk. 2002). Hal ini dalam keadaan inaktif hingga protease membelah proregion yang dilindungi (Zanetti, Gennaro et al., 2000). Studi imunohistokimia menemukan bahwa LL-37, berasal dari neutrofil, telah terdeteksi pada *junctional epithelium* (Dale, Kimball et al. 2001). *Defensin* dan LL-37 terlokalisir di berbagai tempat pada *gingiva*, yang menyarankan bahwa mereka mungkin memainkan peran yang berbeda di tempat-tempat tertentu di mana mereka diekspresikan (Dale, Kimball dkk. 2001). Karena AMP ini memiliki efek sinergis, adanya AMP pada saliva dapat memberikan pertahanan antimikroba alami (Tao, Jurevic et al., 2005). Lokasi yang berbeda dalam rongga mulut dimana berbagai dominasi AMPs dikeluarkan, terdapat pada Gambar 2.



Gambar 2. Berbagai letak di rongga mulut dimana AMP yang berbeda didominasi secara umum. Dale dan Fredericks 2005; izin dari Horizon Scientific Press

Alpha- dan *beta-defensins* adalah peptida dengan enam *disulfide-linked cysteines*. Secara struktural, perbedaan antara kedua defensin terletak pada panjang segmen peptida antara enam sistein dan pasangan sistein (Bals and Wilson, 2003). Enam alphatefensins manusia yang berbeda telah diidentifikasi sejauh ini, termasuk empat peptida neutrofil manusia, HNP1-4, dan dua lainnya dikenal sebagai defensin manusia 5 dan 6 (HD-5, HD-6) (Ganz, Selsted et al 1985 ; Ganz dan Lehrer 1994; Cunliffe 2003).

Alpha-defensin kaya akan arginin dan terlokalisasi baik butiran *azurophilic* neutrofil atau sel *Paneth*, yang merupakan epitel dari mukosa usus. Pada kondisi gingivitis, neutrofil mendominasi daerah lesi, namun relatif proporsional dibandingkan dengan sel plasma dan limfosit dalam neutrofil menurun selama transisi ke periodontitis (Kinane dan Bouchard 2008; Nussbaum dan Shapira 2011). Gangguan pada produksi neutrofil telah dikaitkan dengan kerusakan jaringan periodontal dan penyakit periodontal akhirnya (Crawford, Wilton et al., 2000).

Dalam neutrofil, *human-alfa-defensin* berlimpah dan bekerja sama dengan *epithelium oral* untuk memberikan pertahanan pada kolonisasi mikroba, terutama di *junctional epithelium* pada permukaan gigi (Dale dan Fredericks 2005). Studi telah menunjukkan bahwa dua patogen periodontal, *P.gingivais* dan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, serta bakteri komensal non-patogen *S. gordonii* tidak peka

terhadap aktivitas *human-alfa-defensin* (Miyasaki, Bodeau et al 1990 ;Zhong, Yang dkk. 1998; Raj, Antonyraj dkk. 2000). Namun, apabila ekstra asam amino ditambahkan ke ujung *N-terminus* dan ujung C-HNP2, aktivitas antibakteri menjadi disempurnakan terhadap bakteri yang sama ditunjukkan, menunjukkan anatomi struktural sangat penting sebagai penentu aktivitas antibakteri AMP ini (Raj, Antonyraj et al., 2000).

HNP 1-3 terdeteksi pada *junctional epithelium* dan cairan gingiva crevicular (GCF), selain itu GCF dari pasien dengan periodontitis agresif dan kronis menunjukkan secara signifikan peningkatan kadar HNP 1-3 dibandingkan dengan pasien sehat (McKay, Olson et al, 1999; Dale, Kimball dkk. 2001). Meningkatnya konsentrasi *alpha* dan *betadefensin* berkorelasi pada pasien dengan periodontitis kronis dengan jumlah patogen periodontal *P. gingivais*, *T. denticola*, dan *T. forsythia* (Puklo, Guentsch et al 2008).

HNP1 dan HNP2 terbukti mengurangi respons sitokin pro-inflamasi IL-6, sekaligus meningkatkan respons antibodi terhadap adhesin *P. gingivais* tertentu pada tikus (Kohlgraf, Ackermann dkk., 2010). Dengan demikian, *alpha-defensins* mungkin memainkan peran kunci sebagai mediator imunitas bawaan pada gingiva terhadap mikroba periopatogen

Beta-defensin 1 dan 2 (hBD-1 dan hBD-2) ditemukan pada jaringan gingiva normal dan tidak terinflamasi sebagai bagian dari mekanisme pertahanan host bawaan (*innate host defence mechanism*) (Krisanaprakornkit, Weinberg et al 1998; Dale, Kimball dkk. 2001). hBD-1 dan hBD-2 dilokalisasi pada *margin gingiva* dimana sebagian besar terpapar bakteri oral dari plak di permukaan gigi, tapi tidak pada *junctional epithelium*. Dengan demikian, *junctional epithelium* dilindungi oleh *alpha-defensins* dan LL-37 yang dilepaskan oleh neutrofil, sedangkan *stratified epithelia* dilindungi oleh *beta-defensins*.

Secara struktural, *reduced* hBD-1 berbeda dari *oxidized* hBD-1, dan pengurangan jembatan disulfida oleh hBD-1 menyebabkan peptida menjadi AMP yang lebih poten dalam melawan bakteri patogen oportunistik, seperti *Candida albicans* dan spesies *Lactobacillus* (Schroeder, Wu dkk. 2011). Modulasi struktural hBD-1, tergantung pada lingkungan tempat tinggalnya dalam rongga mulut, bisa melindungi epitel yang sehat melawan kolonisasi oleh bakteri komensal dan bakteri periopatogenik. Namun, dibandingkan dengan *beta-defensin* lainnya, hBD-1 hanya menunjukkan efek minor

terhadap bakteri rongga mulut, seperti *P. gingivais*, *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, dan *F. nucleatum* (Ouhara, Komatsuzawa et al 2005).

Dalam epitel oral, ekspresi hBD-2 ditemukan pada jaringan gingiva normal dan yang tidak terinflamasi, dan diinduksi oleh berbagai bakteri (Krisanaprakornkit, Kimball et al., 2000; Dale, Kimball et Al. 2001; Chung dan Dale 2004). Ekspresi hBD-2 setelah adanya penolakan dari bakteri komensal menunjukkan bahwa epitel oral normal sudah pada keadaan memuncak dalam memerangi patogen yang berpotensi berbahaya (Krisanaprakornkit, Kimball et al., 2000; Chung dan Dale 2004).

hBD-3 telah menunjukkan aktivitas bakterisida terhadap berbagai bakteri rongga mulut, termasuk bakteri patogen periodontal *A. actinomycetemcomitans* dan *P. gingivais*, dan bakteri kariogenik *Streptococcus mutans* (Maisetta, Batoni et al., 2003).

Studi tentang regulasi induksi *beta-defensin* mengungkapkan berbagai cara gingiva epithelia merespon adanya bakteri patogen dan non-patogen. Sebuah studi mengungkapkan bahwa ekspresi hBD-3 dalam menanggapi yang bakteri patogen periodontal *T. denticola* diatur melalui TLR2 (Shin, Kim et al., 2010).

Cathelicidin AMPs memiliki karakteristik heterogen dan serupa dengan AMP lainnya, seperti residu dasar, sifat amphipathic keseluruhan, dan muatan positif bersih pada pH netral (Dale dan Fredericks 2005). LL-37, satu-satunya anggota famili *cathelicidin* manusia yang telah ditranskripsi oleh gen CAMP (*cathelicidin antimicrobial peptide*), yang diterjemahkan menjadi 18 kDa proprotein (Zanetti, Gennaro et al., 2000; Zaiou, Nizet et al., 2003). AMP ini telah terdeteksi dan diekspresikan dalam jumlah yang lebih tinggi di antara neutrofil yang bermigrasi melalui *junctional epithelium* ke sulkus gingiva (Dale, Kimball et al, 2001). Peptida ini hadir pada lokasi yang berbeda dari *beta-defensins*, menunjukkan bahwa dapat memiliki peran yang berbeda pada periodontium. Ekspresi LL-37 terdeteksi dalam jarak yang luas pada epitel dan lokasi tubuh lainnya, termasuk *junctional epithelium*, keratinosit epidermal yang meradang, lidah, mukosa bukal dan saliva mengikuti stimulasi inflamasi (Frohm, Agerberth et al 1997; Frohm Nilsson, Sandstedt et al. 1999; Dale, Kimball dkk. 2001; Murakami, Ohtake dkk. 2002; Howell 2007). *Junctional epithelium* juga mengekspresikan IL-8, mengikuti lereng yang mengarah ke migrasi direksional neutrofil ke dalam sulkus gingiva saat terpapar bakteri (Tonetti, Imboden et al 1994). Dengan demikian, migrasi neutrofil melalui jaringan

mungkin menjadi alasan untuk ekspresi LL-37 pada epitel gingiva (Dale, Kimball et al 2001; Dale dan Fredericks 2005). LL-37 telah menunjukkan aktivitas antimikroba melawan bakteri patogen periodontal *A. actinomycetemcomitans* (Gomez-Garces, Alos dkk. 1994), sementara tidak efektif melawan beberapa bakteri kariogenik, termasuk *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus* dan *Actinomyces viscosus*, serta patogen periodontal *P. gingivais* (Altman, Steinberg dkk. 2006).

Pertahanan epitel gingiva secara imunologi dilakukan oleh neutrofil, sel T, sel dendritik, makrofag, dan sel mast yang terdapat pada epitel, lamina propria, dan sulkus gingiva. Selain itu, epitel gingiva secara aktif berperan sebagai *innate immunity* dengan mensekresikan AMPs dan IL-8, sitokin inflamasi, seperti faktor nekrosis tumor (TNF) - α , IL-1 α , dan IL-1 β . Epitel dari berbagai bagian tubuh menunjukkan adanya HBD-2 dan -3 hanya pada kondisi infeksi atau pembengkakan. Namun, epitel gingiva klinis sehat ditandai dengan adanya HBD-2 dan gradien IL-8 yang memandu transmigrasi neutrofil melalui epitel junctional, kemungkinan disebabkan karena paparan bakteri mulut secara terus-menerus (Ji Suk, 2013).

Neutrofil merupakan sel yang sangat dominan yang diamati pada sulkus subgingiva dan pada cairan gingiva crevicular (GCF). Neutrofil dari jaringan ikat masuk ke dalam sulkus gingiva dengan gradien interleukin IL-8 yang dihasilkan oleh sel epitel. Neutrofil yang berada pada sulkus gingiva secara aktif bakteri plak fagositosis. Neutrofil juga menghasilkan LL-37 dan *human neutrophil defensins* (Ji Suk, 2013). Neutrofil polimorfonuklear merupakan salah satu *first-responders* sel-sel inflamasi untuk bermigrasi ke daerah inflamasi, setelah *chemoattractants* seperti interleukin-8 yang disekresikan oleh sel epitel oral, sel fibrosa dan sel imun. Neutrofil polimorfonuklear berumur pendek, dan setelah berinteraksi dengan patogen dan toksinnya, sel ini mati dalam jumlah besar pada daerah *acute inflammatory periodontal*. Akumulasi dan kematian besar neutrofil polimorfonuklear merupakan penyebab utama kerusakan jaringan pada periodontitis progresif (Silva Nora, 2015). Oleh karena itu, neutrofil sering disebut sebagai pedang bermata dua karena sangat penting untuk pertahanan terhadap mikroba sub-gingiva tetapi juga terlibat dalam kerusakan jaringan periodontal (Ji Suk 2013).

Infiltrasi neutrofil meningkat pada lesi periodontal, dan neutrofil aktif melepaskan berbagai molekul yang merusak jaringan termasuk metastasis, matrik metaloproteinase (MMPs), *reactive oxygen species* (ROS), dan sitokin inflamasi. Induksi pelepasan *tissue-destructive molecules* dari neutrofil oleh patogen periodontal secara berulang kali merupakan salah satu mekanisme patogen yang menyebabkan kerusakan periodontal. Namun, ketika kita membandingkan kemampuan bakteri periodontopatik (*F. nucleatum* dan *T. denticola*) untuk menginduksi pelepasan *tissue-destructive molecules*, termasuk ROS, MMP-8, dan IL-1 β , dari neutrofil, dengan spesies nonperiodontopatik (*S. sanguinis*), maka didapatkan hasil *S. sanguinis* adalah penginduksi yang paling berpengaruh dan *T. denticola* adalah yang terkecil. Ditemukan juga bahwa tingkat *tissue-destructive molecules* yang dihasilkan oleh neutrofil berkorelasi positif dengan tingkat fagositosis. Oleh karena itu, kemampuan bakteri rongga mulut untuk menginduksi *tissue-destructive molecules* dari neutrofil dikaitkan dengan tingkat fagositosis dan bukan dengan patogenisitas bakteri, dan ini bukan karakteristik bawaan dari bakteri periodontopatik. Mengingat resistensi patogen periodontal terhadap fagositosis oleh neutrofil, tidak hanya *T. denticola* tetapi juga patogen periodontal lainnya diharapkan dapat menginduksi tingkat molekul perusak jaringan yang relatif rendah dari neutrophil (Ji Suk, 2013).

Respon imun adaptif diaktifkan saat *epithelial barrier*, dengan peptida antimikroba dan komponen sistem bawaan lainnya sudah dilewati. Sitokin atau interleukin integral dengan respon ini dan mewakili *intercellular messengers*. Sesuai kesepakatan dengan Gemmell dkk., respon imun terhadap infeksi diatur oleh keseimbangan antara sitokin T helper (Th) 1 dan Th2. Diferensiasi subset sel T Th1 dan Th2 ditentukan oleh sejumlah faktor, termasuk antigen itu sendiri, dosis antigen, rute pemberian, sifat antigen-presenting cell dan co-stimulatory molecules. IL-18, sebagai kofaktor dengan IL-12, dikenali sebagai sitokin yang mampu meningkatkan pematangan sel T naif ke sel Th1. Namun, tidak ada konsensus tentang respon kekebalan Th1 / Th2 pada penyakit periodontal. Beberapa penelitian telah menunjukkan penurunan respons Th1 pada periodontitis, sementara yang lain telah menunjukkan peningkatan respons Th2. Namun, penelitian lain mengindikasikan adanya dominasi respon Th1 atas respons Th2, dengan penelitian lain menunjukkan dominasi sel Th0 pada periodontitis. Pengetahuan variabel

ini membingungkan pemahaman saat ini tentang pengembangan dan pengendalian periodontitis (Mariano, 2010).

Sitokin T-helper 1 berhubungan dengan *infectious inflammatory bone destruction*, sementara antagonis klasiknya sitokin T-helper 2 berperan untuk meminimalkan bone loss. Sel T-helper 1 terutama terlibat dalam respon imun seluler, dan dihasilkan di bawah pengaruh interleukin-12 atau interferon- γ yang mengarah pada pengaktifan faktor transkripsi T-bet. Interferon- γ yang berperan pada T-helper 1, dikaitkan dengan produksi sitokin inflamasi dan kemokin serta aktivasi fagosit. Cara kerja T-helper 2 bergantung pada interleukin-4, sitokin T-helper 2 prototipikal, dan faktor transkripsi faktor GATA. Interleukin-4 menghambat transkripsi sitokin pro-inflamasi dan interferon- γ , kemudian menekan polarisasi sel T-helper 1 (Mariano, 2010).

Chemokines adalah keluarga besar protein kecil yang secara struktural mirip dengan protein pengikatan heparin, yang dikelompokkan menjadi 4 subfamili sesuai dengan konfigurasi residu sistein di dekat ujung N, tergantung pada apakah 2 sistein pertama dipisahkan (CXC, CX3C) atau tidak (CC, C) dengan asam amino intervening. Reseptor kemokin dinamai menurut keluarga ligan mereka, dengan dua subfamili utama yang ditunjuk CCR dan CXCR. Ini disintesis oleh beberapa jenis sel, termasuk sel endothelial, epitel, dan stroma, seperti fibroblas, sel tiang dan tulang, serta leukosit. Terkait dengan penyakit periodontal, Boyle dkk. mengemukakan bahwa integritas jaringan tulang bergantung pada pemeliharaan ekuilibrium antara resorpsi tulang oleh osteoklas dan endapan tulang oleh osteoblas. Mekanisme pengaturan utama aktivitas osteoklas tampaknya dilakukan oleh anggota keluarga reseptor TNF, RANK (reseptor aktivator faktor- β), osteoprotegerin (OPG), dan ligand RANK (RANKL). RANK diekspresikan pada prekursor osteoklastik dan pada osteoklas dewasa, sementara RANKL, protein transmembran, diekspresikan secara khusus pada osteoblas di bawah kondisi homeostatik. Interaksi antara RANK dan RANKL diperlukan untuk diferensiasi dan pengaktifan osteoklas, sebuah peristiwa yang diatur oleh OPG, yang sangat menghambat resorpsi tulang dengan mencegah keterlibatan RANK-RANKL. RANKL juga menginduksi produksi beberapa zat, seperti MCP-1 / CCL2, yang dapat menyebabkan resorpsi tulang. Osteoblas ditemukan untuk mengekspresikan beberapa reseptor kemokin selama sintesis, yang dapat memodulasi fungsinya melalui pengikatan kemokin. Selain

itu, osteoklas dapat menghasilkan kemokin penting yang terlibat dalam rekrutmen neutrofil dan subset limfosit yang berbeda, menunjukkan peran menarik osteoblas dalam pengembangan reaksi kekebalan inflamasi. Selanjutnya, produksi kemokin, dengan chemoattraction sel inflamasi di lingkungan tulang, dapat menyebabkan terganggunya homeostasis tulang, mengakibatkan kerusakan jaringan. Oleh karena itu, subset dari leukosit berupa *infiltrate* inflamasi, sel Th1 atau Th2, dapat menentukan tingkat penghancuran / pengendapan tulang karena sel populasi ini berbeda dalam sifat bermigrasinya. Kedua sel T dan B hadir dalam jaringan penyakit periodontal. Infiltrasi pada lesi periodontal terdiri dari limfosit, makrofag, neutrofil dan sel mast yang bermigrasi ke jaringan, dipandu oleh berbagai konsentrasi kemokin dan sitokin. INF- γ (respon Th1) yang dihasilkan oleh sel T akan meningkatkan aktivitas fagositik makrofag dan neutrofil dan mengandung infeksi. Namun, jika ada produksi IL-4 (respons Th2), sel B diaktifkan dan memulai produksi antibodi. Penelitian telah memverifikasi tanggapan antibodi yang kuat terhadap antigen bakteri tertentu, seperti LPS atau leukotoxin dari *A. actinomycetemcomitans* dan LPS atau hemagglutinin *P. gingivais*, yang dikaitkan dengan penyakit yang kurang parah pada pasien dengan periodontitis agresif atau kronis. Peran protektif produksi antibodi lokal, seperti yang terdeteksi oleh peningkatan konsentrasi antibodi cairan celah gingiva, tidak jelas. Beberapa peneliti telah menyarankan bahwa, dalam fase kronis penyakit ini, respons antibodi umumnya bersifat protektif, memfasilitasi pembersihan bakteri dan menahan perkembangan penyakit ini (Mariano, 2010).

Regulatory sel T

Di luar subpopulasi Th1 dan Th2 dari sel T, yang menentukan respons terhadap infeksi berdasarkan pola sitokin yang diinduksi, subset sel T CD4 +, yang disebut sel T regulator berperan dalam peraturan jaringan yang mengendalikan respon imun. Sel Treg yang terjadi secara alami, CD4 + dan CD25 + T cells, berasal langsung dari timus selama tahap awal perkembangan sel T janin dan neonatal. Sel-sel ini membentuk sekitar 5-10% kolam sel T perifer dan secara konstituen mengekspresikan beberapa suppressing mediator, seperti reseptor CD25 (α rantai IL-2), glukokortikoid yang menginduksi TNF-R (GITR), limfosit T sitotoksik Ag-4 (CTLA-4), CD103 dan faktor transkripsi Foxp3. Berbeda dengan sel Treg alami intrathymic, sel Treg yang dapat diinduksi dihasilkan di

perifer, setelah patogen dihilangkan untuk mencegah autoimunitas sekunder. Sebenarnya, kehadiran sel T regulator telah dikaitkan dengan beberapa respons kekebalan, seperti alergi, asma, dermatitis atopik, rhinitis, dermatosis inflamasi, dermatitis spongiotik, psoriasis, lichen planus dan leishmaniasis dan baru-baru ini dijelaskan dalam berpartisipasi dengan sel Treg dalam penyakit periodontal (Mariano, 2010).

DAFTAR PUSTAKA

- Altman, H., D. Steinberg, et al. (2006). "In vitro assessment of antimicrobial peptides as potential agents against several oral bacteria." *J Antimicrob Chemother* 58(1): 198-201.
- Bals, R. and J. M. Wilson (2003). "Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides." *Cell Mol Laife Sci* 60(4): 711-20.
- Bosshardt Dieter. 2005. *The Junctional Epithelium: from Health to Disease*. *Journal of Dental Research* 84 (1) p: 12.
- Brown KL, Hancock RE. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol* 2006;18:24-30.
- Chung, W. O. and B. A. Dale (2004). "Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species." *Infect Immun* 72(1): 352-8.
- Chung WO, Dommisch H, Yin L, Dale BA. Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease. *Curr Pharm Des* 2007;13:3073-83.
- Cole, A. M., P. Dewan, T. Ganz (1999). "Innate antimicrobial activity of nasal secretions." *Infect Immun* 67: 3267-3275.
- Chatterjee. 2006. *Essential of Oral Histology*. New Delhi : Jaypee Brothers Medical Publication
- Dale, B. A. (2002). "Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease." *Periodontol* 2000 30: 70-8.

- Dale, B. A. and L. P. Fredericks (2005). *Antimicrobial Peptides in the Oral Environment. Antimicrobial Peptides in Human Health and Disease*. R. M. Gallo. San Diego, Horizon Bioscience: 223-252.
- Dale, B. A. and L. P. Fredericks (2005). "Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease." *Curr Issues Mol Biol* 7(2): 119-33.
- Defraia E, Marinelli A. Oral manifestations of congenital neutropenia or Kostmann syndrome. *J Clin Pediatr Dent* 2001;26:99-102.
- Diamond, D. L., J. R. Kimball, et al. (2001). "Detection of beta-defensins secreted by human oral epithelial cells." *J Immunol Methods* 256(1-2): 65-76.
- Diamond, G., J. P. Russell, et al. (1996). "Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10): 5156-60.
- Frohm, M., B. Agerberth, et al. (1997). "The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders." *J Biol Chem* 272(24): 15258-63.
- Frohm Nilsson, M., B. Sandstedt, et al. (1999). "The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6." *Infect Immun* 67(5): 2561-6.
- Gartner, leslie P and james L. Hiatt. 2007. *Color textbook of histology third edition*. Philadelphia Elsevier Saunder.
- Gomez-Garces, J. L., J. I. Alos, et al. (1994). "Bacteremia by multidrug-resistant *Capnocytophaga sputigena*." *J Clin Microbiol* 32(4): 1067-9.
- Hancock, R. E. and D. S. Chapple (1999). "*Peptide Antibiotics*." *Antimicrob Agents Chemother* 43(6): 1317-23.
- Hancock, R. E. and G. Diamond (2000). "*The Role Of Cationic Antimicrobial Peptides In Innate Host Defences*." *Trends Microbiol* 8(9): 402-10.
- Hancock, R. E. and M. G. Scott (2000). "*The Role Of Antimicrobial Peptides In Animal Defenses*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16): 8856-61.
- Howell, M. D. (2007). "The role of human beta defensins and cathelicidins in atopic dermatitis." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7(5): 413-7.

- Ji Suk et al., (2013). "Innate immune response to oral bacteria and the immune evasive characteristic of periodontal pathogen". *J Periodontal Implant Sci* 43:3-11.
- Krisanaprakornkit, S., A. Weinberg, et al. (1998). "Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue." *Infect Immun* 66(9): 4222-8.
- Lehrer, R. I. and T. Ganz (2002). "Defensins of vertebrate animals." *Curr Opin Immunol* 14(1): 96-102.
- Lehrer, R. I., A. K. Lichtenstein, et al. (1993). "*Defensins: Antimicrobial And Cytotoxic Peptides Of Mammalian Cells.*" *Annu Rev Immunol* 11: 105-28.
- Maisetta, G., G. Batoni, et al. (2003). "Activity of human beta-defensin 3 alone or combined with other antimicrobial agents against oral bacteria." *Antimicrob Agents Chemother* 47(10): 3349-51.
- Mariano Flavia Sammartino, et al. (2010). "The role of immune system in the development of periodontal disease: a brief review". *Rev. odonto cienc* 25 (3): 300-305.
- Marshall RJ. Gingival defensins: linking the innate and adaptive immune responses to dental plaque. *Periodontol* 2000 2004;35:14-20.
- Murakami, M., T. Ohtake, et al. (2002). "Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva." *J Dent Res* 81(12): 845-50.
- Newman Takei & Klokkevold Carranza. 2014. Carranza's Clinical Periodontology 12th Ed. Elsevier
- Ouellette, A. J. (1999). "Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier." *American Journal of Physiology* 277: G257-261.
- Ouhara, K., H. Komatsuzawa, et al. (2005). "Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells." *J Antimicrob Chemother* 55(6): 888-96.
- Premratanachai, P., S. Joly, et al. (2004). "*Expression And Regulation Of Novel Human Betadefensins In Gingival Keratinocytes.*" *Oral Microbiol Immunol* 19(2): 111-7.
- Pütsep K, Carlsson G, Boman HG, Andersson M. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet* 2002;360:1144-9.

- Rock, F. L., G. Hardiman, J.C. Timans, R.A. Kastelein, J.F. Bazan (1998). "A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 588-593.
- Sahasrabudhe, K. S., J.R. Kimball, T. Morton, W. Weinberg, B.A. Dale (2000). "Expression of the antimicrobial peptide, human β -defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva." *Journal of Dental Research* 79: 1669-1674.
- Schroeder, B. O., Z. Wu, et al. (2011). "Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1." *Nature* 469(7330): 419-23.
- Schroeder HE. 1969. Ultrastructure of the Junctional epithelium of the human gingiva. *Helv Odontol Acta* : 17:6-18.
- Selsted, M. E., S.I. Miller, A.H. Henschen, A.J. Ouellette (1992). "Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense." *Journal of Cell Biology* 118: 929-936.
- Shin, J. E., Y. S. Kim, et al. (2010). "Treponema denticola suppresses expression of human β -defensin-3 in gingival epithelial cells through inhibition of the toll-like receptor 2 axis." *Infect Immun* 78(2): 672-9.
- Silva Nora et al.,(2015)."Host response mechanism in periodontal disease". *J Appl Oral Sci* 23(3):329-55
- Som, A., S. Vemparala, et al. (2008). "Synthetic mimics of antimicrobial peptides." *Biopolymers* 90(2): 83-93.
- van Wetering, S., P. J. Sterk, et al. (1999). "Defensins: key players or bystanders in infection, injury, and repair in the lung?" *J Allergy Clin Immunol* 104(6): 1131-8.
- Sugawara Shunji et al. (2002)." Innate immune hresponses in oral mucosa". *Journal of Endotoxin Research* Vol.8 No.6.
- Tao, R., R. J. Jurevic, et al. (2005). "Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children." *Antimicrob Agents Chemother* 49(9): 3883-8.
- Valore, E. V., C. H. Park, et al. (1998). "Human β -defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues." *J Clin Invest* 101(8): 1633-42.

- Zaiou, M., V. Nizet, et al. (2003). "Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence." *J Invest Dermatol* 120(5): 810-6.
- Zanetti, M., R. Gennaro, et al. (2000). "Structure and biology of cathelicidins." *Adv Exp Med Biol* 479: 203-18.
- Zhao, C., I. Wang, et al. (1996). "Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells." *FEBS Lett* 396(2-3): 319-22.

Chapter 3 Penggunaan obat-obatan untuk mempertahankan gingival dan HGEC

1. Hubungan terapi kombinasi *irsogladine maleate* (IM) dan *azithromycin* (AZM) pada inflamasi di *lipopolysaccharide* (LPS)-induced gingival epithelial cells.

Feng, Xiaodong; Liu, Jingming. A combination of irsogladine maleate and azithromycin exhibits additive protective effects in LPS-induced human gingival epithelial cells. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 72, Number 2, February 2017, pp. 91-94(4)

Metode: *Human gingival epithelial cell* OBA-9 distimulasi oleh LPS untuk menjadi model periodontitis, diikuti dengan perawatan dengan *irsogladine maleate* (IM) atau *azithromycin* (AZM) dengan konsentrasi berbeda. *Transepithelial electrical resistance* (TER) dari setiap sel dianalisa, dan qRT-PCR dan *western blott* digunakan untuk menganalisa ekspresi *cytokine*. Pewarnaan *Immunofluorescence* untuk melihat ekspresi protein

Hasil: TER dari sel berkurang, ketika *cytokine* inflamasi IL-6, IL-8, IL-1 β and TNF- α meningkat pada LPS dibandingkan dengan kontrol ($P < 0.05$). Bagaimanapun, TER meningkat ketika level *cytokine* berkurang oleh adanya IM atau AZM, tetapi efek tersebut lebih jelas terlihat pada sel dengan kombinasi IM dan AZM ($P < 0.01$). E-cadherin dan vimentin lebih banyak pada IM dan AZM.

Kesimpulan: Kombinasi terapi dari IM dan AZM menghasilkan hasil sangat baik untuk menghambat progress inflamasi dari periodontitis

2. Pengaruh *basic fibroblast growth factor* terhadap *human gingival epithelial cells* (HGEC)

Takayama S, Yoshida J, Hirano H, Okada H, Murakami S. Effects of basic fibroblast growth factor on human gingival epithelial cells. *J Periodontol.* 2002 Dec;73(12):1467-73.

Basic fibroblast growth factor (FGF-2; bFGF) mempengaruhi proliferasi dan produksi *extracellular matrix* dari periodontal ligament (PDL), sedangkan pada *gingival epithelial cell* sedang diteliti dengan cara HGEC diisolasi dari epitel gingiva, dan ekspresi mRNA FGF-2 dan FGF receptors (FGFRs) telah dieksaminasi oleh *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR).

Distribusi FGF-2 di jaringan gingiva terdeteksi oleh analisis *immunohistological* menggunakan *monoclonal antibody* untuk *human recombinant* FGF-2, yang telah digunakan sebagai BF-2. Respon proliferasi HGEC terhadap FGF-2 diinvestigasi dengan mengukur *thymidine uptake*.

Hasil: RT-PCR mengungkapkan bahwa HGEC mengekspresikan FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, and FGFR-4 mRNA; tetapi tidak ada FGF-2. FGF-2 diobservasi secara lokal di dalam ruang interselular epitel gingiva, tetapi tidak ada di dalam sitoplasma sel. Pewarnaan BF-2 pada ruang interselular hilang setelah perawatan dengan heparitinase,

Analisis *in vitro* menunjukkan bahwa FGF-2 meningkatkan respon *proliferative* pada HGECs. Bagaimanapun costimulasi dengan *fetal calf serum* menghambat proliferasi HGEC yang diinduksi FGF-2, tetapi costimulasi yang sama secara sinergis meningkatkan proliferasi sel PDL.

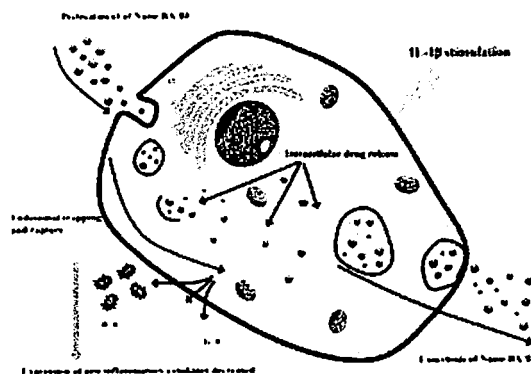
Kesimpulan: FGF-2 terdapat pada ruang interselular dari *gingival epithelium* melalui *heparansulfate* dan meregulasi pertumbuhan dan sitodiferensiasi dari HGEC melalui *cell-type specific receptors*.

I. 3. *Nanoparticle-encapsulated baicalein* untuk memodulasi respon pro inflamasi pada *gingival epithelial cells*

II. Xuan Li, Wei Luo, Tsz Wing Ng, Ping Chung Leung, Chengfei Zhang, Ken Cham-Fai Leung, Lijian Jiu. Nanoparticle-encapsulated baicalein markedly modulates pro-inflammatory response in gingival epithelial cells. *Nanoscale*, 2017,9, 12897-12907

Flavonoid alami seperti *baicalin* (BA) dan *baicalein* (BE) memiliki efek anti inflamasi. Bagaimanapun kelarutan rendah dan bioavailabilitas rendah membatasi aplikasi biomedis. Oleh karena itu, BA dan BE dikapsulkan menggunakan *synthesized and amine-modified mesoporous silica nanoparticles* (MSNs) (Nano-BA and Nano-BE,), dan *loading efficiencies* dan *releasing profiles* diamati. Sitotoksik nya diamati pada *primary human gingival epithelial cells* (hGECs), *uptake cellular* dari Nano-BA atau Nano-BE divisualisasi menggunakan transmisi *electron microscope*. Sifat anti-inflamasi dievaluasi IL-1 β -*treated* hGECs menggunakan *array* *cytokine array* dan *enzyme-linked immunosorbent assay*. Hasil studi menunjukkan bahwa *amine-modified* MSNs dapat mengkapsulkan BA dan BE, dan *nano-encapsulation* sangat meningkatkan *drug delivery rate* dan memperpanjang pelepasan BA and BE hingga 216 jam. Terlebih Nano-BA dan Nano-BE dapat diinternalisasi hGECs dan bertahan intraseluler di dalam media *nanoparticle-free* selama 24 jam. *Pre-treatment* Nano-BE secara efektif menurunkan regulasi IL-1 β -yang diinduksi IL-6 dan IL-8 pada hGECs.

Kesimpulan: *Nanoparticle-encapsulated* BE menunjukkan efek anti-inflamasi melalui pelepasan efektif dan internalisasi..



4. Vitamin D menstimulasi proliferasi epitelial sel dan memfasilitasi penutupan luka melalui jalur cathelicidin secara *in vitro*

Nazzal A, Tipton DA, Karydis A, Slominski A and Stein SH. Vitamin D Stimulates Epithelial Cell Proliferation and Facilitates Wound Closure via A Cathelicidin Independent Pathway *In Vitro*. 2016. Vol.2 No 2:8.

Vitamin D diketahui memiliki peranan penting dalam menstimulasi *antimikroba peptida*, *human cathelicidin* (LL-37) dan meningkatkan ekspresi dari kode gen untuk mengenali pola reseptor pada mikroba. Vitamin D, meskipun memiliki efek yang menguntungkan, dapat menyebabkan *hypercalcemia*, tetapi terdapat vitamin D analog yang lebih poten di bandingkan vitamin D dan tidak menyebabkan *hypercalcemia*. Vitamin D dan vitamin D analog keduanya menstimulasi produksi LL-37 pada *human gingiva Epithelial sel* (S-G). Pada studi ditunjukkan bahwa kekurangan vitamin D berdampak pada beberapa jaringan pada tubuh karena hampir disetiap jaringan menunjukkan adanya reseptor dari vitamin D. LL-37 diketahui memiliki efek pleiotropik dan mempunyai variasi dari fungsi fisiologis, termasuk aktivitas antibakteri, kekuatan pertahanan *innate*, menghambat osteoklasgenesis, menekan sitokin proinflamatori dan memperbanyak marker anti inflamasi. Monosit, neutrofil dan bagian dari limfosit T mempunyai kemotaktik reseptor yang merespon LL-37. Pada hasil penelitian antara vitamin D dan vitamin D analog sama - sama meningkatkan stimulasi LL-37, yang mungkin dapat memperbaiki pasien periodontitis agresif.

Pada penelitian lain dilaporkan bahwa vitamin D memiliki fungsi sebagai pro-proliferative atau sebagai anti-proliferative. Vitamin D terlihat sebagai *anti-proliferative* pada sel tumor, tetapi menstimulasi proliferasi pada sel jenis lain. Ketika vitamin D dan *noncalcemic* vitamin D analog digunakan pada penderita *hyperproliferative skin disorders* seperti *psoriasis* (keradangan pada kulit yang kronis), vitamin D memiliki efek *anti-proliferative*.

Vitamin D menunjukkan keuntungan dalam proses penyembuhan. Pada proses penyembuhan melibatkan banyak reseptor Vitamin D dan peningkatan produksi dari *cathelicidin* LL-37. Dengan adanya peningkatan LL-37 membuktikan adanya

kemampuan dalam efek antimicroba dan mengurangi sitokin pro-inflamasi. Vitamin D dan vitamin D analog meningkatkan produksi LL-37 pada penelitian proses penyembuhan secara *in vitro*, dengan adanya tanda-tanda peningkatan makan vitamin D dan vitamin D analog dapat digunakan dalam pengobatan penyakit periodontal.

5. *Nanofibrous membrane* memberikan efek respon inflamasi pada sel gingiva

David-Nicolas Morand , Olivier Huck, Laetitia Keller, Nadia Jessel, Henri Tenenbaum and Jean-Luc Davideau. 2015. Active Nanofibrous Membrane Effects on Gingival Cell Inflammatory Response. *Materials* 2015, 8, 7217–7229.

Anti inflamasi seperti *alpha melanocyte stimulating hormone* (α -MSH) terlihat selama proses penyembuhan luka secara *in vivo* yang terstimulasi oleh ada adanya *Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide* (Pg-LPS) secara *in vitro*. α -MSH berikatan pada reseptor melakortin dan berfungsi sebagai regulator dari pigmentasi dan produksi kortisol, juga mengatur sitokin pro/anti inflamasi pada keratosit epidermal dan fibroblas.

Membran *poli- ϵ -caprolactone* (PCL) merupakan membran *bio-resorbable* dan telah terbukti dalam menstimulasi regenerasi tulang dan regenerasi dari jaringan periodontal. Membran PCL menunjukkan adanya pertumbuhan dan perlekatan yang baik dari sel dibandingkan dengan membran kolagen yang biasanya digunakan dalam regenerasi jaringan periodontal.

Studi sebelumnya menunjukkan bahwa α -MSH dikombinasikan dengan poly-L-glutamic acid (PGA) dan membandingkan dengan α -MSH saja. Selanjutnya PGA- α -MSH dihubungkan dengan *polyelectrolyte multilayers* untuk menstimulasi reaksi anti-inflamasi pada saraf gigi secara cepat dan mengurangi reaksi inflamasi pada tracheal buatan di tikus. Hasilnya sel epitel yang distimulasi oleh Pg-LPS dan diberi PGA- α -MSH memberikan hasil yang signifikan dengan berkurangnya IL-6 dan TGF- β yang diobservasi selama 6 jam dan 12 jam.

Membran PCL menunjukkan adanya efek anti-inflamasi dan biokompatibel dengan PGA- α -MSH pada sel epitel rongga mulut manusia dan fibroblas. Kombinasi antara α -

MHS dan membran PCL memberikan dampak yang lebih efisien dibandingkan dengan hanya menggunakan α -MHS saja.

Chapter 4 Jenis marker yang dapat digunakan pada penelitian dengan menggunakan media gingiva

1. Cell adhesion molecules (E-cadherin)

E-cadherin merupakan subkelas dari cadherin yang ditemukan pada epitel berlapis gepeng yang memiliki peran penting dalam menjaga integritas struktural dan fungsi perlekatan dan pertemuan epithelial desmosome interselular. Pada junctional epitelium, E-cadherin berperan penting melawan invasi bakteri, dan level E-cadherin akan berkurang pada jaringan gingiva yang terinflamasi.

Bakteri seperti *Porphyromonas gingivalis* dan *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* menurunkan ekspresi E-cadherin pada kultur sel epitel gingiva. Pada mucosa epithelium usus, gangguan E-cadherin meningkatkan permeabilitas mukosa. Berdasarkan hal tersebut, E-cadherin memiliki peranan penting dalam melawan invasi bakteri pada *gingival junctional epithelium*. (Fujita T, et.al, 2017)

Secara mikroskopis, E-cadherin adalah perlekatan molekul sel homofilik yang mengandung kalsium yang membantu interaksi antar sel. E-cadherin merupakan komponen utama perlekatan epitel gingiva. E-cadherin bertanggung jawab terhadap perlekatan kuat antar protein. Epitel gingiva berperan sebagai barrier mekanik dengan adanya perlekatan E-cadherin. Interaksi E-cadherin juga berperan penting pada retensi sel Langerhans terhadap sel epitel.

Eksperesi E-cadherin pada gingiva sehat berhubungan langsung dengan kualitas barrier pada epitel gingiva. Degradasi E-cadherin sebagai molekul pelekatan antar sel menandakan kerusakan pada gingiva. Pengobatan pada kasus gingivitis dan periodontitis menunjukkan peningkatan ekspresi E-cadherin. Pengurangan ekspresi E-cadherin secara tidak langsung menunjukkan adanya penyakit periodontal, sebagai hasil dari destruksi proteolitik oleh periodontal pathogen seperti *Porphyromonas gingivalis*.

A. Pemeriksaan ekspresi E-cadherin menggunakan media gingiva dengan metode immunohistokimia

Sampel gingiva diambil dari subjek setebal 4 mm, disimpan pada 10% buffer formalin netral dan diletakkan pada paraffin dalam 48 jam untuk menghindari degradasi antigen dan disimpan pada sediaan yang mengandung 3-aminopropyltriethoxysilane. Jaringan dilakukan deparafinisasi sebanyak 2 kali menggunakan xylene masing-masing 10 menit, diletakkan pada alkohol dan dilakukan rehidrasi dengan air.

Jaringan ditransfer ke buffer sitrat dan dilakukan pembuangan antigen menggunakan microwave pada kekuatan 4 selama 30 menit. Kemudian sediaan dicelupkan pada phosphate buffered saline (PBS) 2 kali selama 5 menit dan dikeringkan menggunakan kassa untuk membuang sisa PBS. Sediaan diberikan 3% hydrogen peroksida selama 10 menit, ditaruh 2 kali pada PBS dan disimpan pada power blok selama 20 menit.

Antibodi primer monoclonal antibodi anti E-cadherin (BioGenex) ditambahkan pada jaringan dan dijaga pada temperature ruangan selama 1 jam, setelah itu dibilas 2 kali menggunakan PBS dingin (selama 10 menit tiap sesi). Setelah ditambahkan zat penambah super, dilakukan inkubasi selama 30 menit dan diberi 2 kali PBS dingin, ditambahkan setetes polyhorseradish peroxidase (HRP) dan diinkubasi selama 30 menit.

Setelah itu, sediaan dicuci pada PBS dingin dan ditetesi sediaan DAB (3-diamino benzidine tetra hydrochloride-substrat kromogen). Sediaan dicuci pada air suling yang mengalir dan diberikan Harris Haematoxylin. Setelah dicuci dengan alcohol asam dan xylene, jaringan disimpan dengan disterene dibutyl phthalate (DPX) untuk pemeriksaan mikroskopis pada pembesaran 10x dan 40x. Ekspresi E-cadherin dievaluasi menggunakan intensitas stain. (Arun Ramya dkk,2010)

2. Growth Factor

Growth Factor dan sitokin memiliki peran penting dalam mengatur pelepasan matriks ekstraseluler gingiva. TNF α dan interleukin menginduksi ekspresi dari MMPs selama perubahan growth factor β (TGF β) dan mengatur sintesis dan sekresi serta mendorong produksi inhibitor alami jaringan. Yaitu TIMPs. Growth factor jaringan ikat (CTGF) adalah mediator penting dari proses remodeling jaringan yang menstimulasi fibroblas untuk menghasilkan komponen matriks ekstraseluler sehingga ekspresi dari proses ini akan berkorelasi secara positif. Kondisi lokal yang mendukung angiogenesis di jaringan periodontal menjadi karakteristik dari peningkatan ekspresi dari *growth factor vascular endothelial* (VEGF), dimana aksi sitokin ini melengkapi kemampuan dari regenerasi gingiva.

Perkembangan penelitian terhadap diagnosa penyakit berkembang ke arah dimana resiko periodontal dapat diidentifikasi dan diperkirakan dengan pertimbangan yang objektif yaitu dengan adanya biomarker. Cairan Sulkus Gingiva (GCF) dan jumlah saliva memuat beberapa growth factor, sitokin dan enzim dari host yang dapat memastikan biomarker sebagai perangkat penilaian dari perkembangan penyakit periodontal.

Pada dekade ini, para peneliti mulai menggunakan signaling molekul seperti growth factor untuk memulihkan kerusakan jaringan pendukung gigi dan alasan ini memberikan pengetahuan yang sangat baik terhadap aksi biologik dari growth faktor. Regulasi timbal balik antara ekspresi TIMPs dan MMPs berdasarkan ekspresi growth faktor endogenus dan sitokin.

Keseimbangan dari pengaruh MMPs dan TIMPs pada homeostasis matriks ekstraseluler pada tipe jaringan yang berbeda dapat dikontrol oleh growth faktor yang merupakan sekumpulan hormon polipeptida. Mediator polipeptida lainnya yang mempengaruhi sintesis matriks termasuk beberapa sitokin yakni Interleukin (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10) dan tumour necrosis factor- α (TNF- α). Dengan proses pengikatan pada permukaan sel reseptor *tyrosine kinase*, maka growth faktor akan mampu meregulasi kejadian seluler secara signifikan pada proses regenerasi dan repair termasuk perkembangan sel, proliferasi diferensiasi, kemotaksis, angiogenesis dan sintesis matriks ekstraseluler.

Growth faktor diklasifikasi sebagai mediator biologik yang kurang spesifik dan kurang dikenal pada matriks ekstraseluler yang berasal dari sirkulasi. Growth faktor menunjukkan aksi pleiotropik pada penyembuhan luka dari semua jaringan termasuk jaringan periodonsia. Beberapa growth faktor penting dengan spesifikasi fungsinya masing-masing:

- a. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)
- b. Fibroblast Growth Factors (a-FGF and b-FGF)
- c. Transforming Growth Factors (TGF- β and - α)
- d. Connective Tissue Growth Factor (CTGF)
- e. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
- f. Insulin-like Growth Factors (IGF-I, IGF-II)
- g. Epidermal Growth Factor (EGF)
- h. Hepatocyte Growth Factor (HGF)

Setelah terjadi trauma, proses penyembuhan akan berjalan karena adanya interaksi dari sel-sel dan interaksi dari matriks sel ekstraseluler. Pada proses penyembuhan luka yang normal, growth faktor bertugas sebagai penghubung dari susunan bentuk molekul yang kompleks yang mengatur aktifitas seluler dan penutupan luka. Peran growth factor saat ini diakui dalam homeostasis selama proses inflamasi dan fibrosis.

Penelitian mengenai proses penyembuhan jaringan pada hewan coba, membuktikan bahwa penyembuhan luka pada jaringan lunak meningkat karena adanya peran dari EGF, TGF- α dan β , PDGF, asam and basa FGF. Growth faktor memediasi banyak kejadian yang berhubungan dengan pergantian, penyembuhan dan regenerasi jaringan periodontal. Sel epitel gingiva, fibroblas gingiva dan fibroblas dari ligamen periodontal adalah sel utama yang terlibat dalam proses penyembuhan jaringan. Respon dari sel target terhadap growth factor yang bervariasi didasarkan pada ekspresi dari reseptor sel terhadap growth factor. (Pisoschi, 2008)

Tabel 1. Berbagai Macam Growth Factor, Sumber dan Efeknya

Growth Factor	Source	Effect
PDGF isoforms	Platelets Macrophages Keratinocytes	Fibroblast and macrophage chemotaxis Fibroblast proliferation Extracellular matrix synthesis
FGF	Macrophages Endothelial cells	Fibroblast proliferation Angiogenesis
TGF-β1, 2	Platelets Macrophages	Fibroblast and macrophage chemotaxis Extracellular matrix synthesis Secretion of protease inhibitors
CTGF	Epithelial cells Vascular cells	Extracellular matrix synthesis
EGF TGF-α	Platelets Macrophages Keratinocytes	Reepithelization
IGF	Plasma Platelets	Endothelial and fibroblast proliferation Collagen synthesis
VEGF	Keratinocytes Macrophages	Angiogenesis
IL-1	Neutrophils	Activate growth factor expression in macrophages, keratinocytes and fibroblasts
TNF-α	Neutrophils	Activate growth factor expression in macrophages, keratinocytes and fibroblasts

(Pisoschi, 2008)

3. Interleukin 1-beta

IL-1 merupakan sitokin pro-inflamasi yang melakukan rekrutmen sel ke daerah yang terinfeksi. Sitokin ini memicu terjadinya resorpsi tulang dan menstimulasi prostaglandin (PGE₂) yang dilepaskan oleh monosit dan fibroblast serta melepaskan matrixmetalloproteinase yang mendegradasi protein matriks ekstraselular. Bentuk dominan dari IL-1 yang ditemukan pada jaringan periodontal adalah IL-1 beta yang diproduksi oleh makrofag. Peningkatan level interleukin 1 dilaporkan pada jaringan gingiva yang mengalami periodontitis. IL-1 juga dapat

dideteksi pada gingival crevicular fluid (GCF), jaringan periodontal yang terinflamasi dan peningkatan level dari sitokin ini berhubungan dengan perkembangan penyakit

Inflamasi gingiva dimulai ketika endotoksin atau lipopolisakarida (LPS) dari bakteri menyebabkan tersintesisnya sitokin pro- inflamasi. Salah satu sitokin pro-inflamasi adalah Interleukin 1-beta. Level Interleukin 1-beta merupakan indikator status dari jaringan gingiva dan indikator derajat inflamasi. Pada penelitian, IL-1 beta tidak terdeteksi pada gingiva sehat, terdapat pada gingiva yang mengalami periodontitis dan menurun pada pasien setelah 2 bulan dilakukan perawatan gingiva. (Gamonal J. et al, 2000)

A. Pemeriksaan Interleukin 1-beta menggunakan media Gingival Crevicular Fluid (GCF)

Sebelum dilakukan pengumpulan menggunakan kertas perio, plak supragingiva dieliminasi terlebih dahulu pada sisi gigi yang diperiksa menggunakan kuret dengan menghindari pembersihan pada daerah marginal gingiva. Setelah itu gigi diisolasi untuk meminimalisasi kemungkinan kontaminasi saliva. Sisi krevikular dari gigi dikeringkan secara lembut menggunakan udara.

GCF dikumpulkan menggunakan kertas filter perio yang diletakkan pada sulcus gigi pada area yang diamati dengan tekanan ringan selama 30 detik. GCF dikoleksi di dalam *micro-civettes* dengan 0,5 ml saline buffer fosfat dengan pH 7,2 dan dibekukan pada suhu minus 20 derajat celcius sampai pada hari analisis. Sebelum dianalisis, sediaan disentrifugasi dan kemudian dianalisis untuk pemeriksaan IL-1 beta dengan metode ELISA. (Stefanovska E. dkk, 2012)

B. Pemeriksaan Interleukin 1-beta menggunakan menggunakan media jaringan gingiva

Jaringan gingiva diambil dari subjek penelitian dengan melakukan insisi 1 sampai 2 mm secara subgingiva agar didapatkan bagian margin gingiva, sulcular epithelium dan gingival connective tissue. Spesimen biopsi sesegera mungkin disimpan pada *tissue freezing medium OCT compound* dan dibekukan dalam *liquid nitrogen slurry*.

Bagian cryostat (ketebalan 4-6 mikrometer) didapat, disimpan pada suhu -70 derajat celcius sampai digunakan untuk penelitian. Setelah itu dilakukan pemeriksaan menggunakan metode immunohistokimia.

4. Interleukin-8 (IL-8)

Interaksi kompleks antara sel-sel inflamasi dan elemen di jaringan ikat dimediasi oleh sejumlah molekul protein yang disebut sitokin. Interleukin-8 (IL-8) adalah salah satu sitokin yang memiliki peran kemotaksis terhadap netrofil dan telah diidentifikasi di cairan crevikular. IL-8 adalah aktifator PMN yaitu sitokin ini menyebabkan perubahan bentuk netrofil yang dihasilkan dari proses pavementing dan diapedesi yang menyebabkan terjadi kemotaksis dan perkembangan dari intraseluler bebas kalsium, yang berpotensi terhadap kerusakan respirasi dan eksositosis dari granula-granula primer dan sekunder. IL-8 juga menyebabkan terhentinya transportasi dan adhesi PMNs menuju sel endothelial dan memfasilitasi migrasi transendothelial.

Jumlah IL-8 dalam cairan sulkus gingiva (GCF) khususnya sebagai biomarker untuk penyakit periodontal telah diteliti dalam beberapa penelitian. Para peneliti menyimpulkan bahwa jumlah dari IL-8 bertambah dalam kondisi periodontal yang mengalami kerusakan dibandingkan dengan kondisi periodontal sehat. Pada penelitian lainnya beberapa penelitian menyimpulkan bahwa jumlah IL-8 pada periodontitis kronis berada pada level yang lebih tinggi ketika dibandingkan dengan kondisi periodontal yang telah rusak.

IL-8 juga dapat terdeteksi pada gingiva yang sehat, karena sedikit makrofag dan sel mononuclear pada jaringan gingiva dan netrofil pada GCF dapat ditemukan secara klinis pada jaringan yang sehat. Hal ini berhubungan dengan bagian yang kuat dari gingiva khususnya daerah sulkus gingiva yang merupakan tempat keberadaan dari permanen antigen yang membutuhkan adanya netrofil, makrofag dan APC dimana akan menimbulkan aksi kemotaksis ke arah lingkungan oleh IL-8. (Paul, 2015)

IL-8 memiliki peptide yang memiliki aktifitas kemotaksis untuk beberapa tipe spesifik dari polulasi leukosit. Sitokin ini diinduksi dan disekresi

oleh banyak sel seperti monosit, limfosit, fibroblas, epitel dan sel endothelial yaitu sel synovial. IL-8 mengaktifasi polymorphonuclear leukosit (PMN) saat terjadi inflamasi. Hal ini menyebabkan adhesi dari PMN ke sel endothelial dan migrasi antar sel endothelial khususnya terjadi pelepasan enzim granula dari sel. Pada penyakit periodontal, IL-8 diketahui beradanya pada GCF dan jaringan periodontal.

Penelitian dari McGee dkk, ditemukan adanya konsentrasi dari IL-8 yang signifikan dari margin gingiva ke daerah poket ≤ 3 mm dan lebih dalam dari tepi gingiva ke dasar sulkus gingiva > 6 mm. Pada penelitian yang dilakukan oleh Chung dkk, diketahui bahwa ketiadaan relasi langsung antara IL-8 dan aktivasi PMN menentukan seseorang sedang beresiko mengalami perkembangan penyakit periodontitis. Sementara dalam penelitian lainnya ditemukan tidak adanya perbedaan yang signifikan pada jumlah IL-8 pada GCF antara periodontitis juvenile localized dan yang individu sehat.

Sedangkan berdasarkan penelitian oleh Mathur dkk, menunjukkan adanya jumlah IL-8 yang secara signifikan lebih tinggi pada penyakit periodontal dibandingkan dengan individu sehat. Peran penting dari patofisiologi IL-8 tergantung oleh pengaruh dari neutrofil. Jumlah IL-8 pada GCF pada pasien yang sedang menjalani terapi periodontal akan sangat membantu untuk memonitoring perkembangan dari penyakit periodontal. (Goutoudi, 2012)

Biomarker inflamasi yakni: Interleukin (IL-1 β , IL-6, IL-8), Tumour Necrosis factors (TNF- α), Colony-stimulating factors (M-CSF, G-CSF, GM-CSF), Prostaglandins (PGE), Vascular endothelial growth factors (VEGF), Calcitonin gene related peptide (CGRP), Substance P. Sedangkan Interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-8) adalah sitokin yang terlibat dalam remodeling tulang, resorpsi tulang dan aposisi tulang baru selama proses pergerakan gigi dalam perawatan orthodontic. (Lauritano, 2014)

5. TNF-alfa

TNF-alfa merupakan mediator inflamasi kunci dari penyakit periodontal. Mediator inflamasi ini memiliki peran penting dalam respon imun, meningkatkan

aktivitas neutrophil, dan menstimulasi osteoklas serta membatasi perbaikan jaringan melalui induksi apoptosis di fibroblas. TNF-alfa disekresi dengan aktivasi dari makrofag khususnya untuk respon terhadap lipopolysacharida yang dihasilkan oleh bakteri.

Efek proinflamasi dari TNF-alfa termasuk stimulasi sel endothelial, aktivasi produksi IL-1beta oleh makrofag dan menginduksi PGE2 oleh makrofag dan fibroblas dari gingiva. TNF-alfa meskipun memiliki aktivitas yang sama dengan IL-1beta, tetapi sitokin ini memiliki potensi yang lebih lemah terhadap osteoklas dan memiliki level yang lebih rendah pada jaringan gingiva yang terinflamasi dibandingkan IL-1beta. (Newman, MG, et.al. 2015)

TNF-alfa merupakan glikoprotein yang memiliki banyak aktivitas biologik dan merupakan salah satu media inflamasi paling penting serta berperan dalam respon imun. Literatur menyebutkan sitokin ini diproduksi oleh monosit/makrofag yang memiliki efek pro-inflamasi di mana efek biologis dari sitokin ini tidak hanya relevan dengan masalah gingiva tetapi juga secara langsung atau tidak langsung menyebabkan absorpsi dari tulang dan menghambat pembentukan tulang. (Hang Liao, Chu et.al.,2014)

Level TNF-alfa pada GCF meningkat pada keadaan gingiva yang terinflamasi dan level yang lebih tinggi ditemukan pada individu dengan periodontitis. Peran TNF-alfa dan IL-1beta pada periodontal pathogenesis sangat jelas dan studi pada kedua sitokin ini menunjukkan aplikasi antagonis dari IL-1beta dan TNF-alfa menghasilkan 80% pengurangan sel inflamatori pada tulang alveolar dan 60% pengurangan dari kehilangan tulang. Pengambilan spesimen untuk pemeriksaan TNF alfa pada media GCF dan media jaringan gingiva memiliki prosedur yang sama dengan pengambilan spesimen pada pemeriksaan IL-1 beta dengan metode ELISA untuk media GCF dan immunohistokimia untuk media jaringan gingiva.

6. Interleukin 1 α (IL-1 α)

Interleukin-1 (IL-1, IL-1 α , IL-1 β) diketahui berpotensi menjadi regulator pada proses proliferasi fibroblas, dengan jumlah yang secara signifikan lebih tinggi berada pada GCF dari pasien dengan penyakit periodontal. Pada penelitian yang dilakukan oleh Tomura diketahui bahwa pertumbuhan dari fibroblas gingiva yang maksimal

mengandung 100pg/ml IL1 α dan 50pg/m IL-1 β . Juga disebutkan bahwa terlihat adanya produksi asam uronik meningkat dengan adanya IL-1 yakni khususnya IL1 α memiliki efek yang lebih besar dibandingkan IL-1 β . (Sato, 2005)

Secara khusus, sitokin dalam jumlah yang besar terlihat pada GCF telah diusulkan sebagai marker diagnostic potensial yang berguna dari kerusakan jaringan periodontal, diantaranya yaitu IL 1- α dan IL 1- β yang telah terlihat lebih berperan dibanding dengan interleukin lainnya untuk mengatur respon imun seluler di periodontium. Beberapa sitokin diantaranya IL1- α , IL1- β , IL-6, IL-8, dan TNF- α secara umum diklasifikasikan sebagai sitokin pro-inflamasi dan yang telah diteliti mengalami peningkatan pada cairan gingiva pasien dengan penyakit periodontal.

Penelitian dari Stefanovska dkk, sesuai dengan penelitian oleh Petrow dkk yang mengkonfirmasi kelanjutan dari peningkatan level IL-1 α dan hubungannya dengan peningkatan inflamasi karena plak, yang menunjukkan peran dari IL-1 α dan keberadaannya di GCF sebagai marker yang sensitif terhadap inflamasi yang disebabkan oleh plak. Adhesi bakteri mengaktivasi sekresi dari mediator proinflamasi (IL1- α , IL1- β , TNF- α) dari sel epitel.

Pada waktu yang sama, faktor virulensi yang berdifusi ke jaringan ikat menghasilkan mediator inflamasi oleh sel epitel, juga melakukan stimulasi sel host di area tersebut oleh monosit dan makrofag, fibroblast dan sel mast menghasilkan dan melepaskan sitokin proinflamasi (IL1- β , TNF- α , IL-6, IL-12). Sedangkan PGE2, histamin dan MMPs mendegradasi kolagen dari komponen jaringan ikat. Pada kondisi klinis, peningkatan level IL-1 α dan IL-1 β melanjutkan reaksi rantai dalam pelepasan banyak mediator inflamasi lainnya yang mana melibatkan proses inflamasi. Konfirmasi dari aktivitas ini dapat dilihat dari verifikasi histologi dari perkembangan lesi yakni pada kerusakan periodontal. (Stefanovska, 2012)

7. Antimicrobial peptide (AMP)

AMP terdistribusi secara luas di dalam tubuh manusia dan memiliki aktivitas antimikroba melawan mikroorganisme. Sampai saat ini dikenal 106 jenis AMP yang terdapat pada tubuh manusia. Beberapa jenis AMP berada di dalam rongga mulut dan terdapat pada saliva, jaringan epitelium gingiva dan neutrofil. AMP juga berperan

sebagai molekul aktif pada aktivasi sistem imun, inflamasi, penyembuhan luka dan telah diteliti untuk keperluan aplikasi secara klinis. Berikut beberapa jenis AMP yang terdapat di dalam rongga mulut khususnya pada gingiva dan GCF:

A. Defensins

Defensins merupakan molekul yang pendek, kationik dengan berat molekul rendah (4-5kDa). Defensins diteliti secara ekstensif karena ekspresi yang luas pada tubuh manusia dan kapasitas untuk membunuh semua bakteri gram positif dan negatif, jamur dan virus seperti virus herpes simplex. Defensins pada manusia diklasifikasikan berdasarkan alfa, beta dan gamma berdasarkan panjang, lokasi dan posisi dari sistein dan ikatan rantai peptida

Alfa defensin yang sudah bermaturasi didapat dari neutrophil manusia seperti hNP-1, hNP-2, hNP-3, hNP-4. hNP-1 berperan dalam membunuh bakteri seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli*. Pada manusia sehat, hNP-1 sampai 3 terdapat paling banyak di saliva (sekitar 99%). Konsentrasi hNP-1 lebih tinggi pada saliva pasien yang menderita penyakit mulut seperti lichen planus, leukoplakia dan karsinoma sel skuamosa.

Beta defensin terdiri dari 6 jenis (hBD-1-6) dan semuanya berada pada sel epitel yang melindungi beberapa jaringan dan organ termasuk kulit, permukaan mukosa mulut, jalur respiratori, jalur gastrointestinal, jalur genitourinari dan ginjal. hBD-1, hBD-2, hBD-3 terdapat pada rongga mulut (epitel gingiva, lidah, palatum dan mukosa bukal, ductus saliva dan saliva). hBD-1 dan hBD-2 terletak di dalam lapisan suprabasal pada gingiva normal dan hBD-3 terdapat pada sel epitelial gingiva yang belum terdiferensiasi di dalam lapisan basal.

hBD-1 memiliki peran dalam menghalangi flora normal menjadi oportunistik di mana hBD-2 dan 3 memiliki respon yang besar terhadap lipopolisakarida (LPS) dari bakteri, mediator pro-inflamasi seperti IL-1beta, TNF-alfa, dan IFN-gamma dan lebih efektif melawan hampir semua pathogen. Peptida ini terdapat pada GCF dalam konsentrasi rendah. Pemeriksaan immunohistokimia dilakukan melalui sampel jaringan dari kista radikular, lichen planus, dan leukoplakia

B. Adrenomedullin

Adrenomedullin terdapat pada GCF dan saliva. Meskipun adrenomedullin terdapat pada glandula dan saliva, konsentrasi yang besar terdapat pada saliva. Hal ini dikarenakan sel epithelial memberikan adrenomodullin ke saliva. Pada penelitian, kuantitas dari peptida ini hampir dua kali lipat pada pasien dengan masalah periodontal dibandingkan pasien sehat tanpa masalah periodontal.

C. Statherin

Statherin adalah peptide dengan berat 5,4kDa yang termasuk dalam keluarga histatin. Statherin ditemukan pada saliva dan GCF. Peptida ini disekresi oleh glandula parotis dan submandibular dan menghalangi pertumbuhan bakteri anaerob yang terisolasi pada rongga mulut. Statherin memiliki peran dalam melawan pembentukan plak dan berperan sebagai biomarker pada infeksi di dalam rongga mulut

D. Neuropeptida

GCF terdiri atas neuropeptide, calcitonin yang berhubungan dengan peptida dan substansi P. Neuropeptida Y dan peptida vasoaktif intestinal juga terdapat di dalam cairan saliva. Namun, peran peptida ini sebagai antimikroba terbatas sejak diketahui konsentrasi yang beragam antara 2 sampai 45 pg/ml, di mana jumlah ini lebih rendah daripada konsentrasi hambat minimum yang dibutuhkan untuk melawan bakteri dan *Candida Albicans*. (Khurshid Zohaib et.al. 2015)

8. Gingival Crevicular Fluid (GCF)

Lauritano dkk menyebutkan, GCF adalah sarana diagnostic klinis, karena berisi elemen biokimia yang bervariasi dan susunan seluler yang berhubungan dengan situasi klinis yang berbeda, yang menunjukkan keadaan jaringan periodontal yang sehat selama perawatan orthodontic. GCF bisa berupa eksudat atau transudate. Cairan ini muncul dari gingival margin. Pada beberapa penelitian mengatakan bahwa GCF dihasilkan oleh jaringan vaskuler di gingiva dimana efek dari trauma pada kapiler menghasilkan cairan gingiva.

Pada penyakit periodontal terdapat adanya peningkatan GCF karena hilangnya kontinuitas dari dasar membran epitel junction. Proses ini terjadi karena meluasnya jarak interseluler dari epitel junction dan karena adanya kerusakan parsial dari membran basalis. Hal ini menyebabkan meningkatnya tekanan osmotik pada pembentukan membran yang sebagian bersifat hidrofobik. Perbedaan aliran osmotik mengalirkan cairan kapiler menuju jaringan periodontal.

Eksudat awal yang muncul biasanya serous, tetapi kemudian terkontaminasi oleh molekul inflamasi yang menghasilkan eksudat yang mengandung biomarker yang merepresentasikan bagian metabolic dari jaringan periodontal. Pentingnya GCF dalam penilaian terhadap pergerakan orthodontic dapat dipengaruhi oleh parameter yang berbeda yang tidak secara khusus berhubungan dengan inflamasi dan plak bakteri. Trauma karena resorpsi tulang alveolar pada daerah periodontal yang dalam yang menghasilkan tekanan pada sekeliling jaringan yang mengalami peningkatan produksi GCF, dimana hal tersebut dapat digunakan sebagai tes terhadap faktor yang berpengaruh pada pergerakan orthodontik. (Lauritano, 2014)

A. Biomarker saliva untuk penyakit periodontal

Pada tulisan oleh Korte dan Kinney menyebutkan bahwa saliva dapat digunakan sebagai sumber biomarker untuk diagnosis dan monitoring penyakit periodontal. Analisis dari saliva (cairan rongga mulut) dikenal sebagai suatu bahan yang mudah untuk dikumpulkan yang berisi proporsi dari total GCF yang berasal dari seluruh poket di rongga mulut. Namun, secara jelas bahwa analisis elemen individual dari pathogenesis kompleks dan variabel penyakit seperti periodontitis tidak dapat berguna (seperti yang diharapkan) sebagai investigasi dari banyaknya elemen yang saling tumpang tindih tapi tidak berhubungan dengan penyakitnya. Korte dan Kinney juga menjelaskan tentang identifikasi dari respon host dan marker-marker mikrobiologi untuk periodontitis dan keberhasilan dari penataksanaan penyakit periodontal.

B. Fungsi Gingival Crevicular Fluid dan analisisnya

Jaringan ikat dari periodontal sangat vascular dan difasilitasi oleh emigrasi komponen molekular dan seluler dari darah ke dalam jaringan periodontal sehingga dengan demikian sulkus gingiva dipenuhi oleh GCF. GCF adalah eksudat serum yang mengandung semua molekul penting (komponen komplemen, antibodi) dan komponen seluler (netrofil dan plasma sel) yang berperan dalam respon imun yang diperlukan untuk mencegah invasi oleh bakteri plak subgingival.

Penelitian yang dilakukan pada GCF telah lama dikenal dalam menginvestigasi proses inflamasi lokal dari periodontitis. Barros dkk menjelaskan mengenai pembentukan dan dinamika GCF yang mudah diteliti khususnya mengenai aplikasi dari GCF sebagai sumber biomarker untuk penyakit periodontal. Barros juga menekankan mengenai potensi dari analisis metabolik GCF yang dapat berkembang sebagai biomarker yang sangat akurat dalam menggambarkan interaksi host-patogen.

Pada artikel lainnya yang melengkapi artikel diatas, Wssel dan Preshaw menuliskan tentang tantangan secara klinis dan teknis mengenai analisis dari GCF ini pada periodontitis dan terbatas pada interpretasi yang akurat dari banyak penelitian klinis mengenai GCF pada literatur periodontal. Keseluruhan penelitian tersebut menurut penelitian klinis masih belum dapat dipercaya jika diteliti lebih lanjut dengan metode yang berbeda. Namun Wasssal dan Preshaw dengan jelas menetapkan syarat-syarat dasar dari desain penelitian dan menyatakan bahwa mereka berusaha menghasilkan penelitian yang dapat dibandingkan dengan penelitian independen lainnya dimasa yang akan datang. (Taylor, 2016)

9. Toll-Like Receptor 2 (TLR2)

Toll-Like Receptor merupakan protein transmembran yang berperan penting dalam imunitas bawaan. Terdapat 10 jenis TLR yang terdapat pada tubuh manusia (TLR1-TLR10). Sel epitel gingiva melindungi jaringan periodontal dari mikroorganisme. Salah satu mekanisme perlindungan dari sel epitel gingiva adalah susunan sel yang berlapis dan mengekspresikan TLR khususnya TLR2 dan TLR4.

TLR2 mengenali bakteri dari komponen dinding sel. TLR2 merupakan sinyal bagi reseptor untuk sel bakteri gram positif dengan komponen dinding sel berupa *peptidoglycan (PGN)*, *lipoteichoic acid (LTA)*, *lipoprotein*, *fimbriae*, dan permukaan

sel bakteri dengan protein BspA. Ekspresi TLR2 pada sel epitel gingiva dan fibroblas manusia lebih tinggi pada penderita periodontitis dibandingkan individu sehat.

TLR2 sebagai komponen imunitas bawaan pada gingiva diekspresikan oleh monosit, neutrophil, sel epitel, fibroblas, makrofag, limfosit T dan limfosit B. Oleh karena keberadaannya yang luas pada sel gingiva, TLR2 dapat mengenali sejumlah periodontal pathogen seperti *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* dan bakteri golongan oral treponema. (Newman, MG, et.al. 2015)

Pada penelitian, pemeriksaan ekspresi TLR2 dan TLR4 dapat dilakukan dengan menggunakan sampel jaringan gingiva. Sampel diambil dari subjek dengan ketebalan 2-4 mm dan disimpan di dalam ethanol 95%, selanjutnya diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 4 derajat celcius. Sampel jaringan kemudian diproses dengan dehidrasi melalui 4 kali menggunakan alkohol absolut yang didinginkan, selama 1 jam, ditransfer sebanyak 3 kali ke Xylene selama 1 jam pada suhu 4 derajat celcius, ditanam pada paraffin selama 2 jam pada suhu 56 derajat celcius. Selanjutnya, jaringan dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 mikrometer dan disimpan pada APS dan dilakukan pemeriksaan dengan metode *indirect immunofluorescence*. (Romaldin D'Souza dkk,2016)

10. Toll Like Receptor 4 (TLR 4)

TLR 4 adalah TLR pertama yang diketahui pada manusia dan merupakan reseptor untuk Lipidpolisakarida (LPS) dari bakteri. Pengenalan mikroorganisme dilakukan reseptor pengenal yang dikenali melalui bentuk molekul pelindung. (bentuk molekul yang berhubungan dengan mikroba) seperti LPS dari bakteri gram negatif. Spesifikasi ini mengikutsertakan TLRs untuk mendeteksi kehadiran infeksi dan adanya peradangan, khemotaksis dan respon imun innate antimicrobial.

Sitokin yang mensekresi inflamasi dapat bekerja sebagai parakrin atau autokrin yang berpengaruh pada sel sekitarnya yang menginduksi molekul inflamasi. Sebagai contoh IFN- β diinduksi oleh LPS yang terikat dengan TLR 4 pada makrofag dan menghasilkan produksi dari CXCL-10. Signaling dari TLR 4 dapat diaktifasi oleh

jalur MyD88-dependent atau independent yang menghasilkan induksi sitokin proinflamasi termasuk IL-6.

Namun, oleh jalur MyD88-dependent atau independent secara khusus menghasilkan IFN- β . Meskipun molekul yang menggerakkan terlepasnya sitokin proinflamasi seperti IL-6 telah benar-benar diteliti, molekul yang mencetuskan peningkatan ekspresi IFN- β pada sel epitel manusia tidak data dijelaskan oleh literatur yang ada. Pada penelitian oleh Eskan dkk dijelaskan mengenai interaksi antara TLR 4 dan S1P1 yang menginduksi ekspresi IFN- β pada sel epitel gingiva.

Eskan dkk menyimpulkan bahwa pentingnya identifikasi yang telah dilakukan pada proses peningkatan IFN- β pada tipe sel berbeda., tetapi proses-proses tersebut masih belum jelas pada sel epitel. Penelitian mereka adalah penelitian pertama yang menjelaskan tentang TLR4 dan jalur signaling reseptor dari family S1P yang bekerjasama dalam menghasilkan ekspresi IFN- β dan CXCL-10 pada sel gingiva. Hubungan antara TLR 4 dan A1P1 diilustrasikan dalam respon imun innate yang dapat diatur oleh kerjasama TLR dan GPCR di sel epitel mukosa oral. (Eskan, 2018)

TLR adalah protein transmembran tipe 1 yang kaya akan leucine domain ekstraseluler dan domain dari cytoplasmic pada reseptor Inteleukin (IL-1) mamalia. Ada 10 macam TLR yang terdapat pada manusia dan penamaannya yaitu TLR 1 – TLR 10. Diluar dari sepuluh TLR tersebut, TLR 2 dan TLR 4 diketahui berhubungan dengan komponen dinding sel bakteri. TLR 4 adalah reseptor signaling pertama untuk dinding sel bakteri gram negative komponen lipopolisakarida (LPS).

Gingiva secara konstan terekspos dengan bakteri pathogen yang berasosiasi dengan pola molekul. Sensitifitas dan signaling TLR di jaringan periodontal memiliki peran yang penting dalam respon imun innate dan menjaga kesehatan periodontal. Sel-sel epitel gingiva adalah lapisan multilayer dan ekspresi dari TLR khususnya TLR 2 dan TLR 4. Fibroblas gingiva manusia adalah komponen dari jaringan periodontal yang memiliki komponen TLR 2 dan TLR 4. Kita dapat melihat TLR 2 dan TLR 4 berada pada jumlah yang banyak di fibroblas gingiva yang mengalami periodontitis dibanding dengan individu yang sehat.

Pada Penelitian yang dilakukan oleh Romaldin dkk, mereka meneliti pada individu yang sehat, ekspersi dari TLR 2 dan TLR 4 sedikit lebih tinggi pada sel

epitel dibanding pada sel jaringan ikat. Sama halnya dengan pada pasien periodontitis, ekspresi TLR 2 dan TLR 4 lebih tinggi pada sel epitel dari pada jaringan ikat. Sel epitel gingiva konstan mengalami kontak dengan mikroorganisme oral khususnya bakteri dan saat terjadi pertahanan lapisan pertama, dimana jaringan ikat paling utama dalam menyusun fibroblas yang kemudian akan diekspose. Hal ini menjadi alasan mengapa TLR 2 dan TLR 4 sel epitel level ekspresinya lebih tinggi dibandingkan dengan sel jaringan ikat dari semua grup percobaan. (Romaldin, 2016)

DAFTAR PUSTAKA

1. Arun Ramya, R Hemalatha, KV Arun, TSS Kumar. 2010. E-cadherin and CD-1a expression in gingival epithelium in periodontal health, disease and post-treatment. *Indian Journal of Dental Research*. Vol 21. Issue 3, page 396-401.
2. Eskan et al. 2018. *Sphingosine 1-Phosphate 1 and TLR4 Mediate IFN- β Expression in Human Gingival Epithelial Cells*. *Journal of Immunology* 2018 January 26. 180:1818-1825
3. Fujita T. et.al. 2017. Regulation of defensive function on gingival epithelial cells can prevent periodontal disease. *Japanese Dental Science Review* (2017). 189. page 10
4. Gamonal J. et.al. 2000. Level of Interleukin-1beta, Interleukin 8, dan Interleukin 10 dan RANTES in Gingival Crevicular Fluid and Cell Populations in Adult Periodontitis Patients and the Effect of Periodontal Treatment. *J Periodontol*. Vol 71. Number 10, page 1535-1545.
5. Goutoudi et al. 2012. *Effect of Periodontal Therapy on Crevicular Fluid Interleukin-6 and Interleukin-8 Levels in Chronic Periodontitis*. Clinical Study, *International Journal of Dentistry* 2012. Greece
6. Hang Liao Chu. Et. al. 2014. Expression and distribution of TNF-alfa dan PGE2 of periodontal tissue in rat periodontitis model. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Page 412-416.
7. Khurshid Zohaib et.al. 2016. Oral antimicrobial peptides: Types and role in the oral cavity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 24. 515-524.

8. Lauritano et al. 2012. *Biomarkers of periodontal tissue in gingival crevicular fluid during orthodontic movements*. An overview. *OA Dentistry* 2014 Jan 18;2(1):1
9. Newman, MG, et.al. 2015. *Carranza's clinical periodontology 12th ed*. Missouri: Elsevier. 525-534.
10. Paul et al. 2012. *Role of Interleukin -8 in Periodontal Diseases*. *Int. Journal of Clinical Dental Science* 2012 September: 3 (2)
11. Pisoschi, C. et al. 2008. *Growth Factors and Connective Tissue Homeostasis in Periodontal Disease*. *Pathogenesis and Treatment of Periodontitis Januari 2012* : Intech open, 4: 55-80
12. Romaldin D'Souza, Bhat Kishore G., Nayak Ramakant, D.Sailaja. 2016. Expression of Toll-Like Receptor 2 and Toll-Like Receptor 4 in Chronic Periodontitis by Indirect Immunofluorescence. *International Journal of Clinical and Biomedical Research*. 2(2): 14-18
13. Sato N. et al. 2005. *The effect of IL-1 α and nifedipine of cell proliferation and DNA synthesis in cultured human gingival fibroblasts*. *Journal of Oral Science*: 47(2): 105-110. Japan
14. Stefanovska E, M.Nakova, K.Ivanovski, M. Popovska.2012. Interleukin-1 (IL1-alfa and IL-1 beta) in Gingival Fluid and Serum of Patients with Gingivitis and Periodontitis. *Balkan Journal of Stomatology*. Vol 16. Page 34-38.
15. Taylor JJ, Preshaw PM. 2016. *Gingival crevicular fluid and saliva*. *Periodontology* 2000 2016 Desember 16: 70(1), 7-10

Chapter 5 FAKTA MENGENAI EPITEL

1. Mukosa Rongga Mulut

Membran mukosa rongga mulut atau yang biasa disebut dengan mukosa rongga mulut adalah suatu permukaan (epitel) yang melapisi rongga mulut. Kelembaban yang terjadi pada mukosa dikarenakan adanya komponen glandula utama, yaitu glandula *salivary minor*. Pada bibir mukosa rongga mulut terhubung dengan kulit, dan pada mukosa oral faring terhubung dengan mukosa lembab yang melapisi *the rest of the gut*, sehingga secara anatomi mukosa rongga mulut terletak diantara kulit dan mukosa gastrointestinal (Nanci, 2008). Secara umum mulut terdiri atas dua bagian, antara lain bagian luar yang sempit (vestibula), yaitu ruang diantara gingiva, gigi, bibir dan pipi; kedua bagian rongga mulut (bagian dalam), yaitu rongga mulut yang dibatasi sisinya oleh tulang maksilaris, palatum, dan mandibularis yang sebelah belakangnya bersambung dengan faring (Setiadi, 2007).

Mukosa rongga mulut dibagi menjadi 3 jenis berdasarkan keratinisasinya yaitu (Avery and Chiego, 2006):

a. Mastikatori mukosa

Mastikatori mukosa yaitu mukosa yang terlibat pada waktu pengunyahan. Lamina propria padat dan terikat erat pada tulang. Pada mukosa ini secara normal ditemukan lapisan keratin yang tipis pada epitelnya yang termasuk daerah ini adalah mukosa palatum durum dan jaringan gingiva.

b. Liningmucosa

Lining mucosa yaitu mukosa pelapis. Pada mukosa ini secara normal tidak ditemukan lapisan keratin pada lapisan epitel yang tebal. Lamina propria tipis

dan elastik, yang termasuk daerah ini yaitu mukosa pipi, ventral lidah, vestibulum, dasar mulut, mukosa bibir, mukosa palatum molle, mukosa alveolar.

c. *Specialized mucosa*

Specialized mucosa yaitu mukosa khusus. Lamina propria padat dan tipis terikat erat pada otot dibawahnya. Pada mukosa ini secara normal mengalami keratinisasi termasuk daerah ini adalah pada dorsum lidah dimana terdapat papila.

1.1 Epitel mukosa rongga mulut

Epitel mukosa rongga mulut sebagai jaringan yang melapisi permukaan mukosa rongga mulut, epitel rongga mulut merupakan barier utama antara lingkungan rongga mulut dengan jaringan yang lebih dalam. Epitel rongga mulut adalah *stratified squamous epithelium*. Terdiri dari sel yang melekat satu sama lain dan tersusun dalam lapisan-lapisan atau stratum-stratum, antara lain (Nanci, 2008):

1. Lapisan keratinisasi (*Stratum corneum*)

Stratum corneum nama lainnya adalah *cornified layer* atau *horny layer*, tersusun atas sel skuamosa. Pola maturasinya sering berupa orthokeratin. Variasi dari keratinisasi yang lain adalah parakeratin. Pada epitel parakeratin nukleus yang piknotik terdapat pada hampir seluruh sel.

2. Lapisan granular (*Stratum granulosum*)

Stratum granulosum terdiri dari sel pipih yang mengandung granula kecil yang disebut *keratohyaline granule*.

3. *Prickle cell layer* (*Stratum spinosum*)

Stratum spinosum terdiri dari sel silindris. Sel tersebut sering kali berjauhan satu dengan yang lainnya, hanya dihubungkan dengan jembatan ekstraselular yang disebut dengan desmosom. Bentuk tersebut memberikan bentuk berduri atau *prickle like*. Bersama dengan stratum basale disebut stratum malpighi.

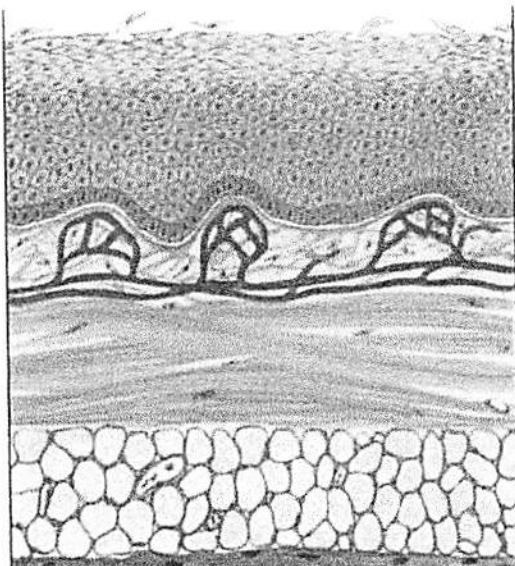
4. Lapisan basal (*Stratum basale*)

Stratum basale disebut juga stratum silindrikum karena bentuk selnya silindris dan melekat pada lamina basalis, jika terjadi mitosis atau penggantian sel rusak atau mati disebut juga stratum germinativum.

1.2 Lamina propria

Dua bagian utama dari jaringan rongga mulut adalah epitel rongga mulut dan lapisan jaringan penghubung dibawahnya, yang disebut dengan lamina propria. Lamina propria ini dibedakan menjadi dua lapis, yaitu *superficial papillary layer* dan *deeper reticular layer*. Bentuk pada lapisan retikuler adalah *netlike* dimana terdapat penyusunan serat kolagen (Nanci, 2008).

Lamina propria terdiri dari sel-sel, pembuluh darah, saraf, dan serat yang terdapat dalam substansi dasar. Beberapa sel tersebut antara lain (Nanci, 2008):



- a. Fibroblas
- b. Makrofag
- c. Sel mast
- d. Sel keradangan

Gambar 1. Struktur mukosa rongga mulut (Balogh *and* Fehrenbach, 2006)

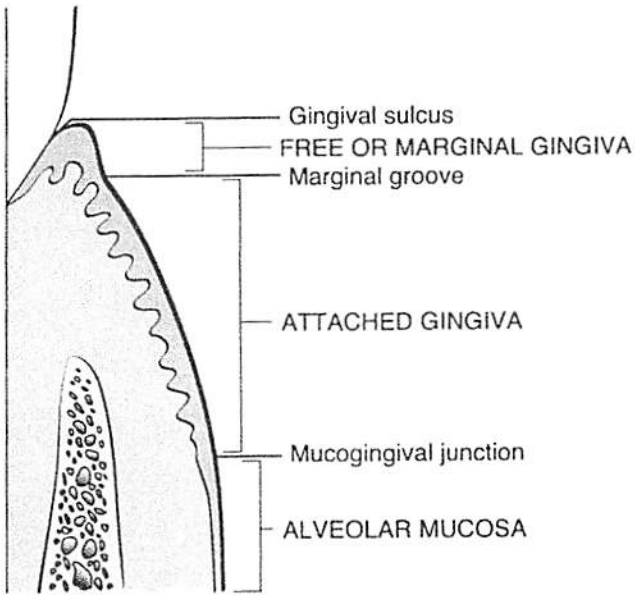
2. GINGIVA

Gingiva merupakan bagian membrana mukosa oral yang menutupi processus alveolaris dan mengelilingi leher gigi. Gingiva melekat pada gigi maupun processus alveolaris. Di sebelah lingual dan vestibular, gingiva membatasi mukosa alveolar, sedangkan di sebelah palatinal, gingiva bersatu dengan mukosa palatum durum sehingga secara klinis tidak dapat dibedakan.

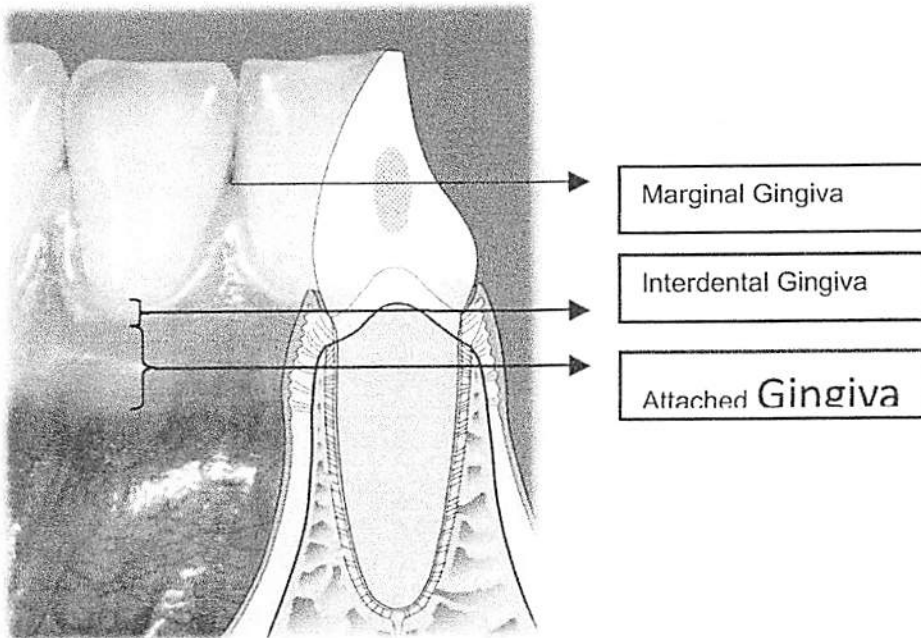
Pada keadaan normal, konsistensi gingiva kuat dan kenyal, terikat kuat pada tulang di bawahnya. Tekstur permukaan gingiva cekat stippling, tetapi tekstur gingiva tepi halus (tidak stippling). Bagian tengah dari papilla interdental biasanya stippling, tapi bagian tepinya halus. Warna gingiva cekat dan tepi secara umum adalah coral pink, yang dihasilkan oleh suplai pembuluh darah, tebal dan tingkat keratinisasi serta pigmentasi. Kontur atau bentuk gingiva sangat bervariasi dan tergantung pada arah gigi dalam lengkung rahang, lokasi dan ukuran daerah dan kontak proksimal, dimensi embrasure gingiva facial dan lingual. Gingiva tepi menutupi gigi dan membentuk seperti kerah baju, mengikuti out line permukaan fasial dan lingual, membentuk garis lurus sepanjang gigi dengan permukaan relatif datar. Bentuk dari interdental gingiva ditentukan oleh kontur permukaan gigi sebelah proksimal dan lokasi serta bentuk dari embrasure gingiva.

Gingiva selalu mendapat stress mekanis yang berasal dari mastikasi dan sikat gigi, selain selalu terpapar oleh bakteri dan saliva dalam rongga mulut. Dalam menghadapi hal-hal tersebut, gingiva mempunyai mekanisme pertahanan diri, yaitu dengan:

- a. deskuamasi sel-sel epitel
- b. turn over sel yang cepat
- c. Pertahanan oleh set keratin
- d. Reaksi imun lokal dan sistemik



Copyright © 2002, W.B. Saunders Company



Gambar 2. Diagram pembagian gingiva berdasarkan anatominya

Berdasarkan anatominya, gingiva dibedakan atas:

a. Gingiva tepi (*marginal gingiva*)

- *Marginal / unattached / free gingiva*
- Merupakan bagian tepi atau *border* dari gingiva yang mengelilingi gigi dengan *collarlike fashion*.
- Pada 50% kasus, ditemukan *free gingival groove* (batas antara *marginal* dan *attached gingiva*).
- Lebar *marginal gingiva* ± 1 mm
- Merupakan dinding jaringan lunak dari sulkus gingiva
- Titik paling apikal disebut *gingival zenith* (dimensi apiko-koronal dan mesio-distal antara 0.06 mm dan 0.96 mm).

b. Gingiva cekat (*attached gingiva*)

- Melekat pada periosteum tulang alveolar
- Aspek fasial gingiva meluas ke mukosa alveolar yang relatif *longgar* dan mudah untuk digerakkan.
- Batas *attached gingiva* dengan mukosa alveolar adalah *mucogingival junction*
- *Firm* dan *resilient*.
- Secara klinis, lebar *attached gingiva* digunakan sebagai parameter diagnostic
- Lebar *attached gingiva* adalah jarak antara *mucogingival junction* dan proyeksi dasar sulkus gingiva atau poket periodontal.
- Lebar *attached gingiva* (pada umumnya):
- Regio insisive RA : 3.5-4.5 mm
RB : 3.3-3.9 mm
- Regio posterior RA (premolar 1) : 1.9 mm
RB (premolar 1) : 1.8 mm
- Perubahan lebar *attached gingiva* disebabkan oleh modifikasi posisi dari koronal (kedalaman sulkus).

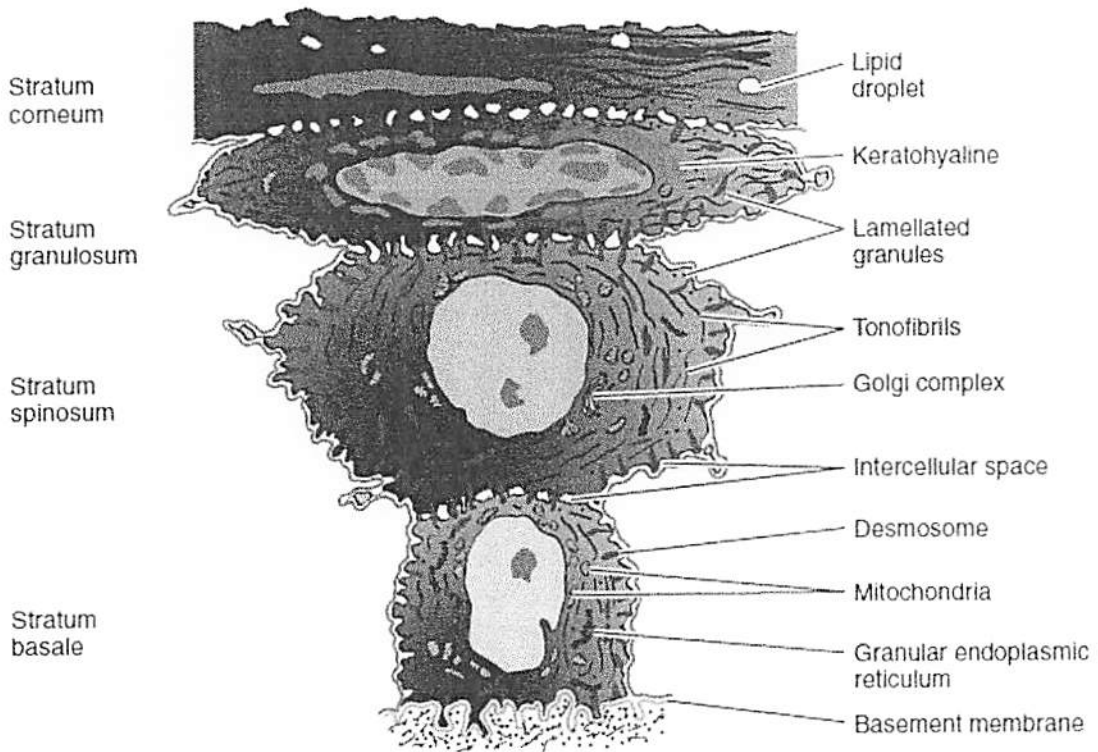
c. Interdental gingiva

- Menempati celah interproksimal di bawah area kontak gigi.
- Dapat berbentuk *pyramid* (anterior) atau "*col*" *shape* (posterior)
- Bentuk gingiva ditentukan oleh

- titik kontak antara gigi yang berdekatan
- jarak antara titik kontak dan puncak tulang osseus
- ada atau tidaknya resesi (Caranza,2015).

2.1 Gambaran mikroskopik gingiva

Berdasarkan pemeriksaan secara mikroskopik, gingiva terdiri dari *Stratified squamous epithelium* dan Jaringan ikat. Fungsi dari epitel tersebut antara lain melekatkan bagian koronal gingiva dengan gigi, pertahanan fisik terhadap infeksi, membunuh mikroorganisme dengan memproduksi antibiotik secara lokal dan membunuh mikroorganisme dan sel-sel yang terinfeksi oleh limfosit intraepitelial.



Gambar 3. Gambaran sel-sel yang terdapat pada epitel squamous stratificatum (Caranza, 2015)

Epitel squamous stratificatum terdiri atas

1. Lapisan basal atau sel formatif terdiri dari sel kolumner dan kuboid.
2. Lapisan spinosum (*stratum spinosum*) atau sel-sel runcing terdiri dari sel-sel berbentuk poligonal.

3.Lapisan granuler (*stratum granulosum*) sel-selnya tersebar terdiri dari banyak partikel keratohialin.

4.Lapisan tanduk (*stratum corneum*) sel-selnya pipih dan berkeratin ataupun berparakeratin.

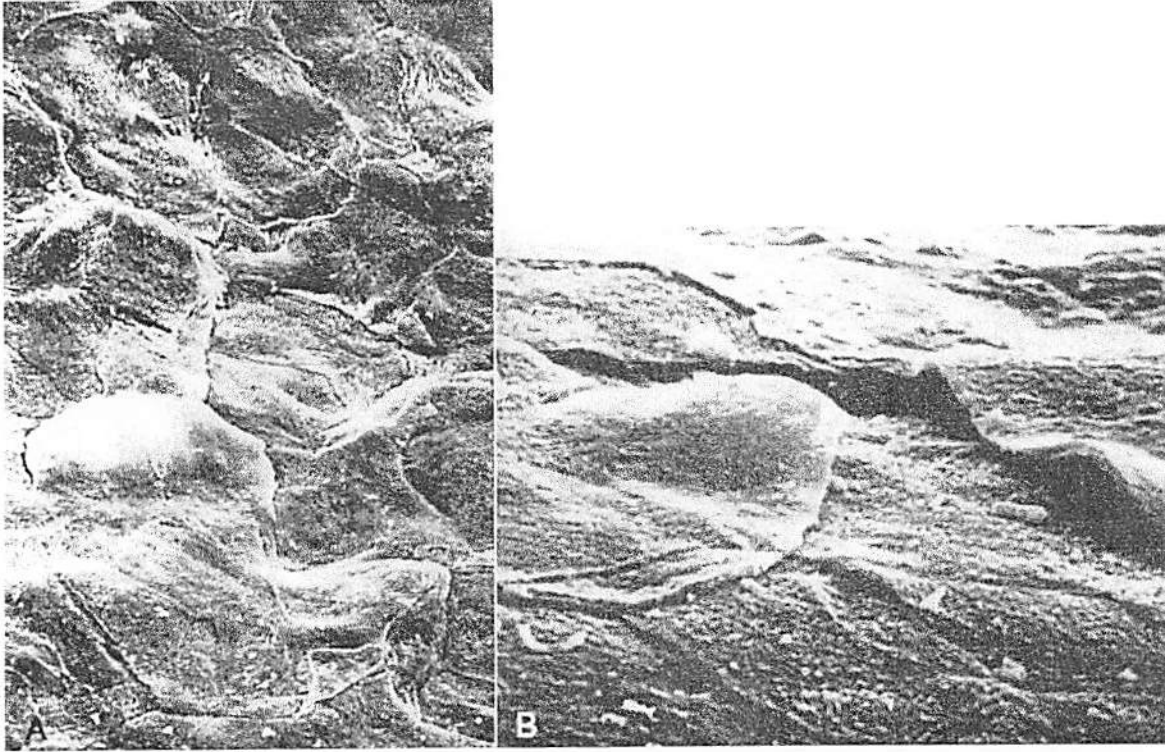
Pada stratum basale, sel-sel mengalami mitosis dan mengalami diferensiasi dengan karakteristik:

- a. Sel-sel kehilangan kemampuan untuk bermultiplikasi
- b.Sel-sel memproduksi lebih banyak protein dan mengakumulasi granula keratohyalin, filamen-filamen keratin dan matriks makromolekul dalam sitoplasmanya.
- c.Sel-sel kehilangan organella-organella sitoplasmik yang bertanggung jawab terhadap sintesis protein dan produksi energi
- d.Sel-sel mengalami degenerasi menjadi lapisan terkornifikasi oleh karena proses keratinisasi intraseluler, tapi tanpa kehilangan perlekatan antar sel
- e. Sel-sel akhirnya terlepas dari permukaan epitel

BOX 1-1 Functions and Features of Gingival Epithelium	
Functions	Constant Renewal
Mechanical, chemical, water, and microbial barrier	Replacement of damaged cells
Signaling functions	Cell-Cell Attachments
Architectural Integrity	Desmosomes
Cell-cell attachments	Adherens junctions
Basal lamina	Tight junctions
Keratin cytoskeleton	Gap junctions
Major Cell Type	Cell-Basal Lamina
Keratinocyte	Synthesis of basal lamina components
Other Cell Types	Hemidesmosome
Langerhans cells	
Melanocytes	
Merkel cells	

Fungsi utama epitel gingiva adalah melindungi struktur yang lebih dalam, melalui proliferasi keratinosit dan diferensiasi keratinosit. Adapun Jenis sel yang terdapat pada epitel gingiva adalah :

a. Keratinosit



Gambar 4.A, Scanning electron micrograph dari gingiva keratinisasi menunjukkan keratinosit yang diratakan dan batasnya di permukaan dari gingiva ($\times 1000$). B, Scanning electron micrograph dari margin gingiva di tepi sulkus gingiva yang menunjukkan beberapa keratinosit akan dikelupas ($\times 3000$).

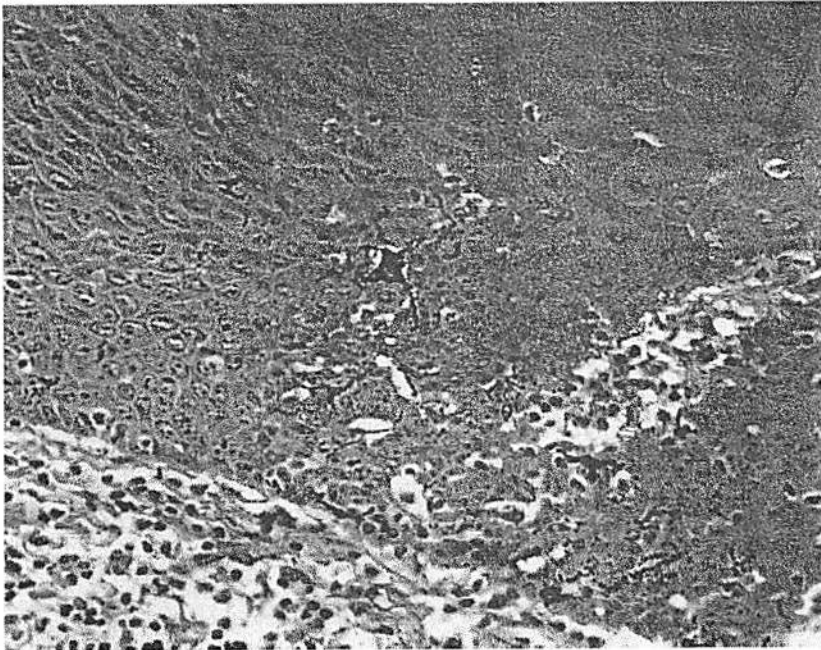
b. Non-keratinosit

- sel Langerhans

adalah sel dendritik yang berada di antara keratinosit pada semua tingkat suprabasal. Mereka milik sistem fagosit mononuklear (reticuloendothelial system) sebagai dimodifikasi monosit yang berasal dari sumsum tulang. Berisi butiran memanjang, dan mereka dianggap makrofag dengan

sifat antigenik yang mungkin. Sel Langerhans memiliki penting Peran dalam reaksi kekebalan sebagai antigen-menghadirkan sel untuk limfosit.

Mereka mengandung granuler g-spesifik (granuler Birbeck), dan mereka telah menandai aktivitas adenosine triphosphatase. Mereka ditemukan di epitel oral gingiva normal dan lebih kecil jumlah di epitel sulkular (Caranza,2015).

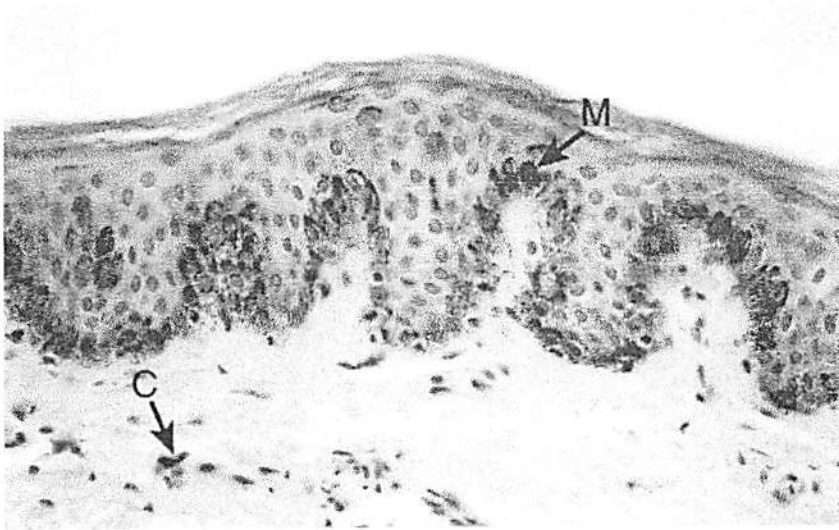


Gambar 5. Epitel gingival manusia, aspek oral. Immunoperoxidase teknik yang menunjukkan sel Langerhans.

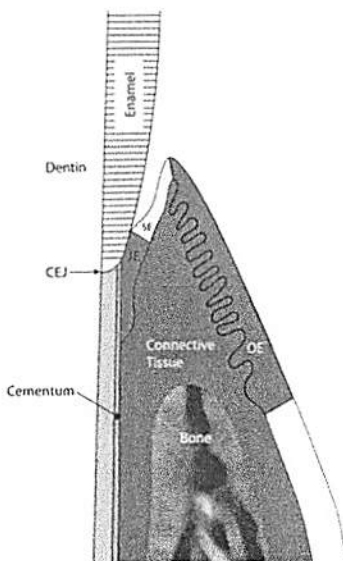
- sel Merkel

Sel Merkel terletak di lapisan dalam epitel, mereka saling berkaitan dan terhubung ke tempat yang berdekatan sel oleh desmosom. Mereka telah diidentifikasi sebagai sentuhan perceptors. Epitel ini bergabung ke jaringan ikat yang mendasarinya lamina basal 300 sampai 400 Å tebal dan aproximal 400 Å di bawah lapisan basal epitel (Caranza,2015).

- sel melanosit



Gambar 6. Gingiva berpigmen pada anjing menunjukkan melanosit (M) pada lapisan epitel basal dan melanophores (C) di jaringan ikat (teknik Glucksman).



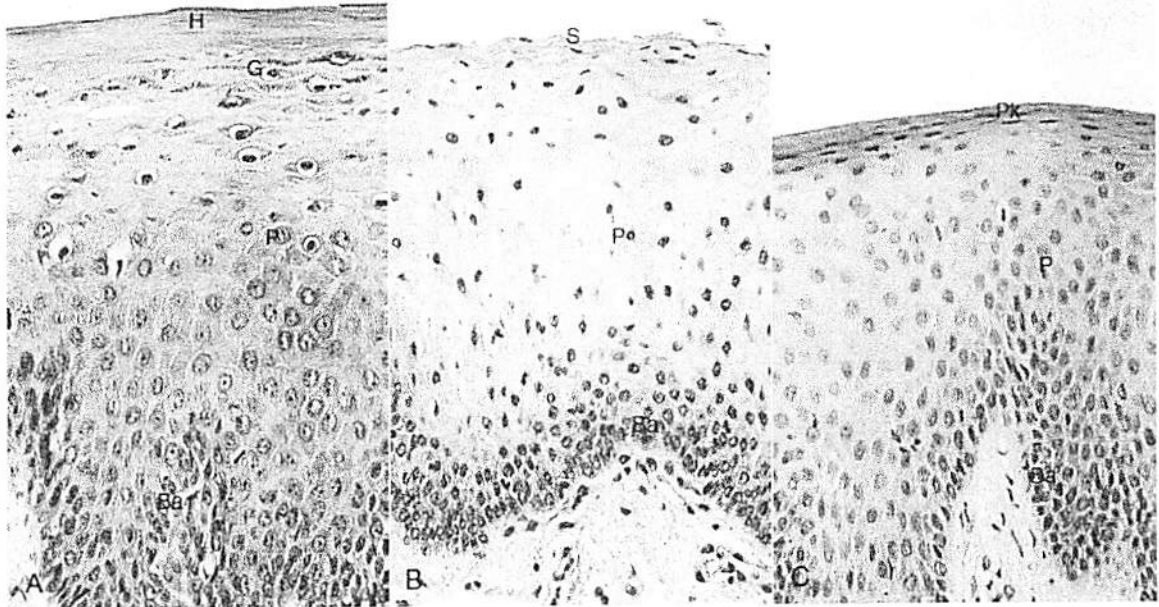
Gambar 7. Gambaran pembagian epitel gingiva berdasarkan areanya. (OE) Oral Ephilium, (SE) Sulcular Epitelium, (JE) Junctional Epitelium.

Berdasarkan area epitel gingiva, dibagi menjadi tiga macam. Yaitu :

a. *Oral Epitelium* (OE)

Lapisan epitel oral atau luar meliputi permukaan puncak dan luar giriva marginal dan permukaannya dari gingiva terlampir Rata-rata, epitel oral adalah 0,2 sampai Ketebalan 0,3 mm. mengalami keratinized atau parakeratinized, atau mungkin kombinasi

kondisi ini. Permukaan yang lazim, bagaimanapun, adalah parakeratinized. Lapisan epitel terdiri dari empat lapisan: stratum basale (lapisan basal), stratum spinosum (lapisan sel prickle), stratum granulosum (granular lapisan), dan stratum korneum (lapisan cornified).



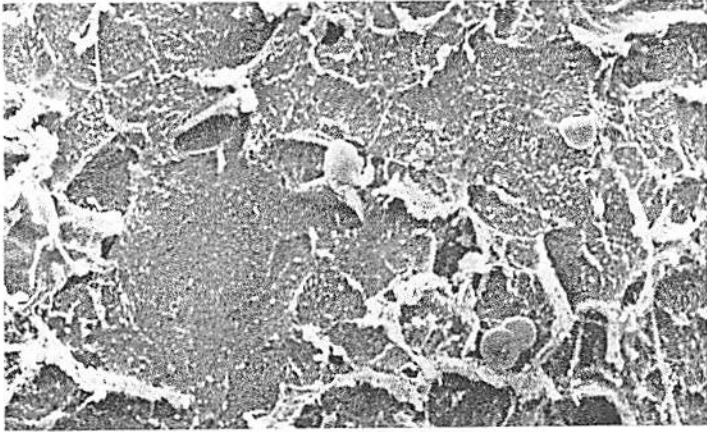
Gambar 8. Variasi epitel gingival. A, Keratinized. B, Nonkeratinisasi. C, Parakeratinisasi. Lapisan tanduk (H), lapisan granular (G), lapisan sel prickle (P), lapisan sel basal (Ba), sel permukaan yang diratakan (S), dan lapisan parakeratotik (Caranza,2015)

b. *Sulcular Epitelium* (SE)

Epitel sulkular melapisi gingival sulkus. Ini adalah skuad berlapis stratified yang tipis epitelium tanpa *rete pegs*, dan itu meluas dari batas koronal dari epitel junctional sampai puncak gingival margin . Biasanya menunjukkan banyak sel dengan hidropik degenerasi. Epitel sulkus memiliki potensi untuk keratinisasi jika terefleksi dan terkena rongga mulut atau jika flora bakteri pada sulkus benar-benar dihilangkan. Sebaliknya, epitel luarkehilangan keratinisasi saat kontak dengan gigi. Temuan ini menunjukkan bahwa iritasi lokal pada sulkus mencegah keratinisasi.

Epitelium sulkular sangat penting; itu mungkin bertindak sebagai membran semipermeabel yang mana produk bakteri berbahaya masuk ke gingiva dan melalui GCF

dalam sulcus. Berbeda dengan epitel junctional, Namun, epitel sulkus tidak banyak disusupi oleh polimorfonuklear leukosit neutrofil, dan tampaknya kurang permeabel.



Gambar 9. Memindai mikroskopis elektron dari epitel Permukaan yang menghadap gigi pada sulkus gingiva normal. Itu epitelium (Ep) menunjukkan sel deskuamasi, beberapa eritrosit yang tersebar (E), dan beberapa leukosit yang muncul (L). ($\times 1000$.)



Gambar 10. Spesimen biopsi manusia yang menunjukkan sulkus gingiva yang relatif normal. Dinding jaringan lunak gingival sulkus terdiri dari oral sulcular ephitelium (ose) dan dibawahnya connective tissue (ct), sedangkan dasar gingiva sulkus terbentuk oleh permukaan sloughing junctional epitel (je). Ruang enamel digambarkan oleh

dense cuticular (dc). Garis demarkasi yang relatif tajam ada antara epitel junctional dan oral sulcular epithelium (panah), dan beberapa polymorphonuclear leukocytes (pmn) dapat dilihat melintas epitel junctional . Sulkus mengandung darah merah Sel yang dihasilkan dari perdarahan yang terjadi pada saat itu dari biopsi ($\times 391$; inset $\times 55$.)

c. Junctional Epitelium (JE)

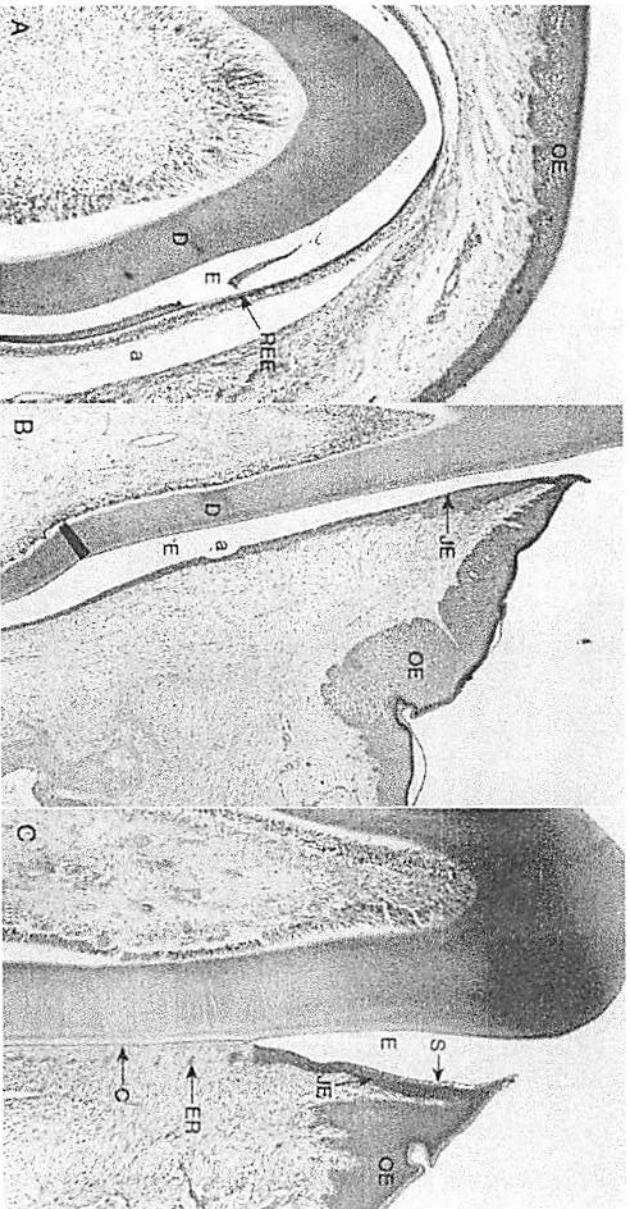
Epitel junctional terdiri dari pita kolagen dari epitel non-keratinisasi berlapis skringing.

Ini adalah 3 sampai 4 lapisan tebal di awal kehidupan, tapi jumlah lapisannya meningkat dengan usia sampai 10 atau bahkan 20 lapisan. Selain itu, junctional epitel meruncing dari ujung korona, yang mungkin 10 sampai 29 sel selebar 1 atau 2 sel lebar pada apikalnya,

yang terletak di persimpangan cementoenamel di jaringan sehat. Sel ini bisa dikelompokkan dalam dua strata: lapisan basal yang menghadap jaringan ikat dan lapisan suprabasal yang meluas ke permukaan gigi. Panjang epitel junctional berkisar antara 0,25 menjadi 1,35 mm (Gambar 11).

Epitel junctional dibentuk oleh pertemuan epitelium oral (OE) dan reduced enamel epithelium (REE) selama erupsi gigi. Epitel junctional melekat pada permukaan gigi (epitel

attachment) dengan menggunakan lamina basal internal. ini melekat pada jaringan ikat gingiva oleh basal eksternal Lamina itu memiliki struktur yang sama seperti penghubung epitel lainnya di tubuh (Caranza, 2015).



Gambar 11. Proses erupsi pada gigi kucing. A, Unerupted tooth. Dentin (D), sisa-sisa matriks enamel (E), reduced enamel epithelium (REE), oral epithelium (OE), and artifact (a). B, Erupsi gigi membentuk junctional epithelium (JE). C, Sepenuhnya erupsi gigi.

Solcus
 dengan epitel debris (S), sementum (C), dan epithelial rests (ER).

Bagian di bawah epitel adalah lamina propria, merupakan jaringan ikat yang terdiri dari serabut kolagen, retikuler, elastik, oksitalan, elemen-elemen vaskuler dan saraf yang terdapat dalam substansi dasar yaitu glikoprotein dan proteoglikan. Sekitar 60-65% dari jaringan ikat gingiva sehat terdiri dari kolagen dengan fibril-fibril individual yang terorganisir ke dalam berkas-berkas serabut yang sifatnya berlainan. Komposisi biokimiawi gingiva sehat terdiri dari kolagen tipe I, III, IV, V dan VI dan protein-protein non kolagen antara lain laminin, fibronektin, osteonektin, glikosaminoglikan dan lain-lain.

Set-sel yang terdapat di lamina propria yaitu:

a. Fibroblas,

Merupakan elemen seluler terbanyak dari jaringan ikat gingiva. Berfungsi mensintesis dan mensekresi jaringan kolagen, elastin, glikoprotein dan glikosaminoglikan. Selain itu

juga mensekresi kolagenase yang berfungsi untuk mendegradasi jaringan kolagen yang tua, sehingga memungkinkan terjadinya remodeling jaringan kolagen

b. sel mast, berfungsi untuk memproduksi heparin dan histamin

c. sel makrofag, berperan dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi, karena mempunyai kemampuan fagositosis

d. sel-sel inflamasi (neutrofil, leukosit pmn, sel-sel plasma), keberadaannya diakibatkan oleh penetrasi substansi antigenik dari kavitas oral melalui epitel junctional.

Epitel junctional dapat dianggap paling menarik struktur gingiva. Interposisi antara soft yang mendasarinya dan jaringan ikat termineralisasi dari periodontium (yaitu, penghubung gingival jaringan, ligamentum periodontal, tulang alveolar, dan sementum akar) menunjuk pada peran penting dalam homeostasis jaringan dan pertahanan terhadap mikroorganisme (Bosshardi, 2005)

Mikroorganisme ini terbentuk kompleks sistem ekologi yang menganut lapisan glikoprotein pada padatan dan nonshedding permukaan dan, oleh karena itu, disebut biofilm. Pada saat biofilm terbentuk pada permukaan gigi, jaringan di sekitar biofilm ini terus diserang. Keadaan eksternal seperti itu membutuhkan adaptasi struktural dan fungsional khusus dari epitel junctional mengendalikan serangan mikrobiologis konstan. Berbeda dengan yang lainnya epithelia, tidak ada lapisan sel epitel keratinisasi pada permukaan

bebas

Epitel junctional yang bisa berfungsi sebagai penghalang fisik. Epitel junctional memenuhi struktural khusus dan kolaborasi epitelnya dan sel non-epitel, yang menyediakan mekanisme antimikroba yang sangat ampuh. Namun, mekanisme pertahanan ini tidak menghalangi perkembangan Lesi inflamasi yang luas di gingiva, dan kadang

kala

Lesi inflamasi pada akhirnya dapat menyebabkan hilangnya tulang dan Jaringan ikat menempel pada gigi.

Analisis ekspresi dari carcino-embryonicMolekul adhesi terkait Ag-1 (CEACAM1)

-a

molekul perekat sel transmembran yang diekspresikan leukosit, epitel, dan pembuluh darah endothelia-terlihat pewarnaan permukaan sel lebih kuat di epitel junctional

dibandingkan dengan epitel sulkisan oral . Dengan demikian, kohesi dinamis dari epitel junctional sel mungkin, sebagian besar, dimediasi oleh CEACAM1. Sejak CEACAM1 juga diungkapkan permukaan PMN, itu juga mungkin memainkan peran dalam epitel junctional. Sebagai tambahan, CEACAM1 berpartisipasi dalam regulasi proliferasi sel, stimulasi, dan coregulasi dari sel T yang diaktifkan. Selanjutnya berfungsi sebagai reseptor sel untuk berbagai bakteri yang berbeda, sebagai konsekuensinya interaksi bakteri dengan CEACAM1 dapat menyebabkan epitel junctional berubah.

Molekul adhesi interselular-1 (ICAM-1 atau CD54) dan Fungsi limfosit antigen-3 (LFA-3) adalah sel tambahan molekul adhesi. Keduanya adalah anggota imunoglobulin. ICAM adalah glikoprotein transmembran seperti imunoglobulin itu memediasi interaksi sel-sel dalam reaksi inflamasi. Mereka berfungsi sebagai ligan untuk molekul integrin 2 yang ada pada leukosit dan berpartisipasi dalam pengendalian migrasi leukosit ke situs peradangan. Ekspresi ICAM-1 dan limfosit fungsi antigen-3 (LFA-3) telah ditunjukkan pada sel epitel junctional.

Pembentukan gradien ICAM-1 Ekspresi dalam epitel junctional diperkirakan terjadi sebuah mekanisme penting untuk membimbing PMN ke arah dasar sulkus, di mana mereka bisa melawan bakteri. Dalam hal ini, Ekspresi tinggi interleukin-8 (IL-8), suatu chemotactic sitokin, di sel-sel koronal paling banyak dari epitel junctional mungkin mekanisme tambahan routing PMNs menuju Tantangan bakteri. Lain sitokin-seperti interleukin-1a (IL-1 a), Interleukin-1b (IL- 1b), Dan tumor necrosis factor- a (TNF - a) - sangat kuat diekspresikan di koronal epitel junctional. Setelah terpapar lipopolisakarida, Hampir semua sel di epitel junctional diberi label kuat untuk sitokin ini .

Dengan demikian, produksi sitokin oleh sel epitel junctional dan makrofag di bagian koronal epitel junctional mungkin berperan dalam pertahanan melawan serangan bakteri di sulkus gingiva Oleh karena itu, dari sudut pandang klinis, ia memiliki

Direalisasikan bahwa epitel junctional mewakili sebuah kunci Mekanisme interaksi inang-parasit, karena aktif berpartisipasi dalam mekanisme pertahanan tuan rumah dan bukan sekadar memberikan keterikatan pada permukaan gigi (Bosshardi, 2005).

3. Epitel sebagai barier pertahanan

Jaringan epitel membentuk barier pertahanan antara tubuh dan lingkungan. Tergantung dari lokasinya, epitel memiliki berbagai fungsi, tapi selalu bertujuan untuk menjaga jaringan di dalam dari stress lingkungan, kerusakan kimiawi, dan infeksi bakteri, baik jaringan epitel di pencernaan maupun di permukaan tubuh. Epitel bertatah pada kulit dan mukosa rongga mulu merupakan contoh dari lapisan epitel yang paling tangguh dan paling protektif. Epitel bertatah pada epidermis serta gingival dan palatum pada mukosa rongga mulut merupakan contoh dari epitel berkeratin. Pada epitel berkeratin terjadi diferensiasi terminal dan menghasilkan sel mati yang berisi protein keratin dan tidak terdapat nucleus maupun organ yang lain. Di sekitar setiap sell mati tersebut terdapat *cornified envelope (CE)* yang terdiri dari protein *cross-linked* dan lipid yang menggantikan membrane plasma dan membentuk bagian penting dari barier epithelial. (Presland & Jurevic, 2002)

DAFTAR PUSTAKA

Avery JK and Chiego DJ, 2006. *Essentials of Oral Histology and Embryology A Clinical Approach*, 3rd edition. St.Louis : Mosby Elsevier. p:177-194

Balogh MB and Fehrenbach MJ, 2006. *Dental Embriology, Histology and Anatomy Illustrated*, 2nd edition. St. Louis: Mosby-Elsevier. p 111-114

Nanci Antonio, 2008. *Ten's Cate Oral Histology Development Structurer and Function*, 7th edition. St.Louis : Mosby Elsevier. p 63-78

Setiadi, 2007. *Anatomi & Fisiologi Manusia*. Yogyakarta : Graha Ilmu. p: 64

Presland RB, Jurevic RJ. 2002. Making Sense of the Epithelial Barrier. *Journal of Dental Education*: Vol. 66, No.4

E. Manuscript of Journal International**DRAFT****The potential of Kouboku (*Magnolia obovata*) to regulate the inflammatory response in human gingival epithelial cell**

Irma Josefina Savitri¹, Udijanto Tedjosongko², Chiquita Prahasanti¹, Ouhara Kazuhisa³, Kurihara Hidemi³

¹Department of Periodontology, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Indonesia

²Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Indonesia

³Department of Periodontal Medicine, Division of Applied Life Science, Institute of Biomedical and Health Science, Hiroshima University, Indonesia

Abstract

Background: Human gingival epithelial cell (HGEC) is the first barrier of periodontal tissue that faces the periodontopathogenic bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). It is strong recommendation that regulating the immune response in HGEC may contribute to the prevention of periodontitis. Kouboku, a traditional oriental medicine, use to treat the illness. Some studies show the potential of Kouboku in modern therapy. However, the advantages and mechanism of natural compounds in oral cavity, especially in periodontal tissue, were remained unclear

Objectives: The aim of this study was to determine the potential of Kouboku for new preventive medicine by regulating the inflammatory response in human gingival epithelial cell.

Methods: Chinese traditional medicine, Kouboku, provided by Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd. Natural compound were diluted in water or Dymethyl Sulfoide up to 10 mg/mL and 100 mg/mL, respectively. OBA-9, an immortalized human gingival epithelial cell line, was used in this study. Kouboku were added thirty minutes before *P. gingivalis* stimulation in OBA-9. Then, the cells were maintained up to 12 hours in 37⁰ C incubator. The Real-time PCR was performed in OBA-9 stimulated with *P. gingivalis* in the presence or absence of Kouboku to determine IL-8, IL-1 β , TLR2 dan TNF- α mRNA expression.

Results: The addition of Kouboku suppressed IL-8 and IL-1 β mRNA expression (p < 0.01) after 12 hours stimulation. However, the suppressive effect of Kouboku did not shown in TLR2 dan TNF- α mRNA expression.

Conclusion: This study revealed that the natural compounds, Kouboku regulate the inflammatory response in gingival epithelium by suppressing IL-8 and IL-1 β mRNA expression.

Keyword: Kouboku, IL-8, IL-1 β , human gingival epithelium

Background

Periodontal disease is one of two major dental diseases that affect human population worldwide at high prevalence rate. It was reported more than 50 percent people in the world suffer from periodontal disease (Petersen, 2005). Periodontitis is an infectious and chronic inflammatory disease characterized by the interaction between host and periodontopathogenic bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) and *Aggregibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*) (Socransky 1994). The present of *A.a* and *P.g* cause the increasing of GCF that associated with periodontitis (Sánchez, 2015).

Some components in the membrane of bacteria are well known to produce pathogenic factors, such as outer membrane protein (Omp) (Bosshardt, 2005; Fujita, 2008), leukotoxin (Fujita, 2012), and protease (Wang, 2001) that induce inflammation in gingival tissue (Kadowaki, 2000). These bacteria also possess lipopolysaccharide (LPS) in the outer membrane as a modulator of inflammation (Ouhara, 2006).

The untreated periodontitis result in damage in periodontal tissue and tooth loss. Furthermore, it is well known there were strong relationship between periodontitis and systemic diseases. Among the associations between oral health status and chronic systemic disease, the link between periodontal disease and diabetes mellitus is the most consistent (Petersen, 2005)

The first line of the interaction between periodontopathogenic bacteria and periodontal tissue is occurred in the Human Gingival Epithelial Cell (HGEC) (Peyyala, 2013). To avoid the bacterial invasion into periodontal tissue, dentists force the patients to perform plaque control mechanically and chemically. Tooth brushing reduce significantly in periodontitis indicators, such as bleeding on probing, gingival index, pocket depth and plaque index (Aspiras, 2013). However, the increase of average length of the life and the increase of prevalence of systemic disease might cause difficulty of plaque control mechanically. Therefore, finding the new and easy way for protecting periodontal tissue is essential for periodontitis prevention.

HGEC are suggested as the first barrier of periodontal tissue that face very frequently periodontopathogenic bacteria and actively contribute the inflammation in periodontal tissue (Fujita, 2018; Teng, 2000). Inside the sulcus, the protection from HGEC formed by two types of epithelial, oral sulcular epithelium and junctional epithelium

Some medicine was reported increase the protection in HGEC. IM influenced the response of gap junctional intercellular communication (GJIC) and IL-8 of HGEC following periodontopathogenic bacterial challenge (Uchida, 2005). IM was also reported regulated some component in HGEC after *A.a* stimulation and a part of mechanism is clarified by molecular biological approach *in vitro*. IM abolished the increasing of IL-8 level, through ERK pathway (Kishimoto, 2008). Furthermore, IM countered the effect of IL-1 β in GJIC (Fujita, 2008), and regulated neutrophil migration and E-cadherin expression (Fujita, 2010). In addition, IM regulated epithelial barrier function againts TNF- α (Fujita, 2011) and the inflammatory-related genes in HGEC were regulated by IM

(Miyagawa, 2013). IM inhibits *P.g*-mediated expression of TLR2 and IL-8 in HGEC (Savitri, 2014). Regarding this previous study, we believe the preventive medicine have a significant role to protect the HGEC.

As first barrier in periodontal tissue, the inflammatory process will occur in the epithelial cells following periodontopathogenic infection. The inflammation is needed as a protection in the host body. However, over production of inflammatory cytokines caused the extension of the chronic inflammation and destruction of periodontal tissue. The prolong inflammation will activate some component in immune system that cause the damage in periodontal tissue. The immune response plays an essential role in the breakdown of connective tissue and alveolar bone (Asakawa, 2003; Inagaki, 2003; Kelk, 2011). Therefore, we need to conduct the effective prevention of periodontitis by eliminating periodontopathogenic bacteria and regulating host immune response.

The protection of HGEC comes from interconnection between cell to another one by desmosome, and occasionally by gap junctional (Bosshardt, 2004; Fujita, 2011). Beside tissue integrity, HGEC also express various molecules that maintenance the normal architecture and functions. Cell adhesion molecules (ex. E-cadherin), cytokines (ex. IL-8, IL1 β , IL1 α , TNF- α), growth factors, natural antimicrobial peptides and protein were present in the HGEC (Bosshardt, 2004).

Other components on the surface of HGEC, Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4, also present on the surface of HGEC. The function of these receptors is recognize the component of bacteria, such as peptidoglycan, Outer membrane protein 29 (Omp29), and lipopolysaccharide that trigger the signaling process inside the cells. The signaling process will induce some gene, in this case inflammatory related genes, to produce

inflammatory cytokines (Wang, 2001; Gelani, 2009; Funderburg, 2007).

Kouboku (*Magnolia obovata*), is a traditional Chinese medicine that widely use as anti microbial (Lee, 2018; Choi, 2017). Honokiol, a physiologically active component of kouboku, markedly inhibited RANKL-induced tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity and the formation of TRAP-positive multinucleated cells in both bone marrow-derived monocytes and RAW264 cells (Hasegawa, 2010). Another active component in kouboku, inhibits the Growth of Non-Small Cell Lung Cancer via Inhibiting Microtubule Polymerization (Shen, 2017). However, the potential effect of kouboku in oral cavity, especially in periodontal disease was remain unclear.

The aim of this study was to determine the potential of Kouboku for new preventive medicine by regulating the inflammatory response in human gingival epithelial cell.

Materials & Methods

Natural Compound Preparation

Kouboku provided by Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd. Natural compound were diluted in water or Dymethyl Sulfofocide up to 10 mg/mL and 100 mg/mL, respectively.

Cell Culture

OBA-9 is the immortalized epithelial cells derived from human gingival tissue (HGEC) kindly gifted by Shinya Murakami from Osaka University Japan. OBA-9 was maintained in Humedia-KG2 medium 1. The cultured medium 1 supplemented with 0.1 g/ml human epidermal growth factor (hEGF), 10 mg/ml insulin, 0.5 mg/ml

hydrocortisone-hemisuccinate, 50 mg/ml gentamicin, 50 g/ml amphotericin and 2 ml bovine pituitary extract (BPE). The cultured medium 2 for bacterial stimulation was not added with any supplement. HGEC were incubated in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37⁰ C.

Bacterial Preparation

P. gingivalis W83 (purchased from the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was cultured on a sheep blood agar plate using the Anaeropack system (Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo, Japan) at 37°C. After 2 days of incubation in the Anaeropack system, *P. gingivalis* was inoculated into 40 mL of trypticase soy broth supplemented with 1% yeast extract, hemin (200 µg) and menadione (20 µg). *P. gingivalis* was harvested at the exponential growth phase and washed with phosphate buffered saline (PBS). *P. gingivalis* were treated with heat inactivated technique. Briefly, *P. gingivalis* keep in heat block machine 68°C for 30 minutes. Cell counting was performed.

Stimulation With Bacteria

Before confluent, the culture medium was changed with medium 2. Kouboku were added into OBA-9 in the culture medium 30 minutes before bacterial infection. In this experiment 10⁸ CFU/ml of heat-inactivated *P. gingivalis* were added into cultured OBA-9. After 12 hours incubation the total RNA were extracted from the HGEC.

To determine the anti-inflammatory effect of natural compound, the mRNA expression and the production of inflammatory cytokine (IL-6, IL-8, TNF-α, IL-1α, IL-

1 β) of OBA-9 with or without oriental medicine are determined by real-time PCR and ELISA. The following primer sets were used in realtime PCR:

IL-8	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3' 5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTTCTC-3'
B actin	5'-GACGGGGTCACCCACACTGT-3' 5'-AGGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'
IL-1 β	5'-CTGCGTGTTGAAAGATGAT-3' 5'-CAGACTCAAATTCCAGCTT-3'
TNF α	
TLR2	5'-GCCAAAGTCTTGATTGATTGG-3' 5'-TTGAAGTTCTCCAGCTCCTG-3'

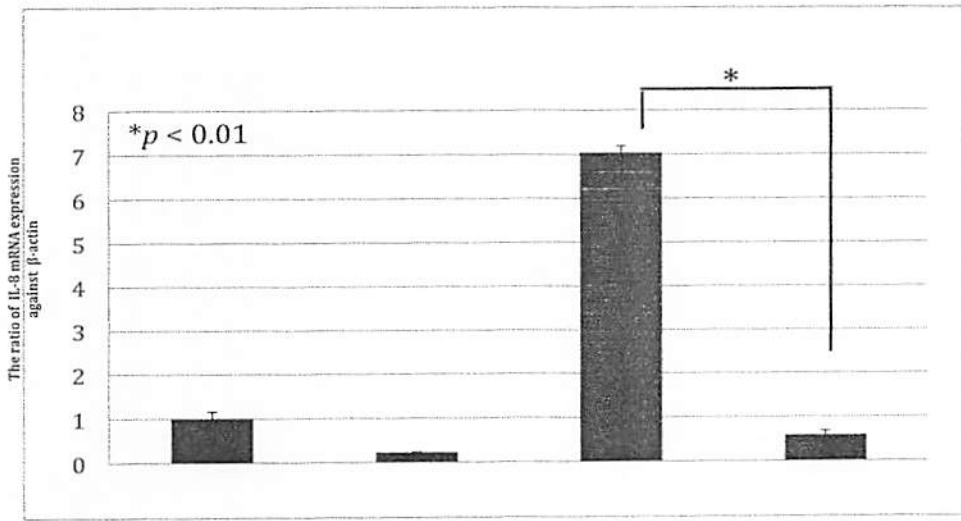
The differences between two groups were analyzed by Student's *t*-test.

Result

To determine the inhibitory effect of Kouboku on enhancement of pro inflammatory cytokine, cells were stimulated with *P. gingivalis* for 12h in the presence or absence of Kouboku. The enhancement of IL-8 mRNA expression in *P. gingivalis*-stimulated OBA-9 was 7.0-fold higher than that with no stimulation. However, the enhancement was suppressed by the presence of Kouboku. The addition of Kouboku in the *P.gingivalis*-nonstimulated OBA-9 did not give any effect on the expression of IL-8 mRNA expression compared with control group (Figure 1).

The suppressive effect of Kouboku also was shown in IL-1 β mRNA expression. After *P. gingivalis* stimulation, the enhancement of IL-1 β mRNA expression in *P. gingivalis*-stimulated OBA-9 was 16.0-fold higher than that with no stimulation.

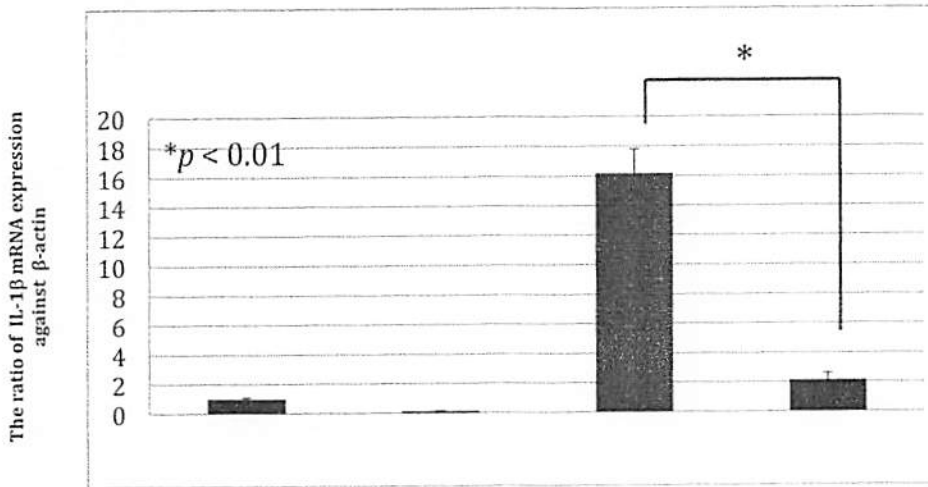
However, Kouboku did not shown any effect on TLR2 and TNF α mRNA expression. (Figure 3 and figure 4).



Figure

<i>P. gingivalis</i>	-	-	+	+
Kouboku	-	+	-	+

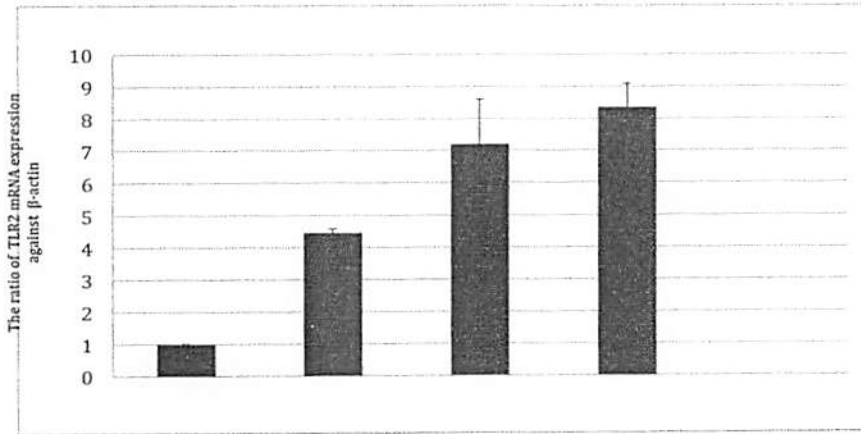
1. Inhibitory effect of Kouboku in the enhancement of IL-8 mRNA expression stimulated with whole Porphyromonas gingivalis in OBA-9 for 12h. To study the inhibitory effect of Kouboku in OBA-9, Kouboku was added to subconfluent cultures of OBA-9, 30 min before stimulation with *P. gingivalis* whole cells (10^8 colony-forming units/mL). To determine expression of IL-8 mRNA, total RNA was extracted and real-time PCR was performed. The values represent the mean + SD of triplicate experiments. * $p < 0.01$, significantly lower than untreated cells (Student's t-test).



<i>P. gingivalis</i>	-	-	+	+
Kouboku	-	+	-	+

Figure 2. Inhibitory effect of Kouboku on enhancement of IL-1 β mRNA expression stimulated with whole Porphyromonas gingivalis in OBA-9 for 12h. To study the inhibitory effect of Kouboku in OBA-9, Kouboku was added to subconfluent cultures of OBA-9, 30 min before

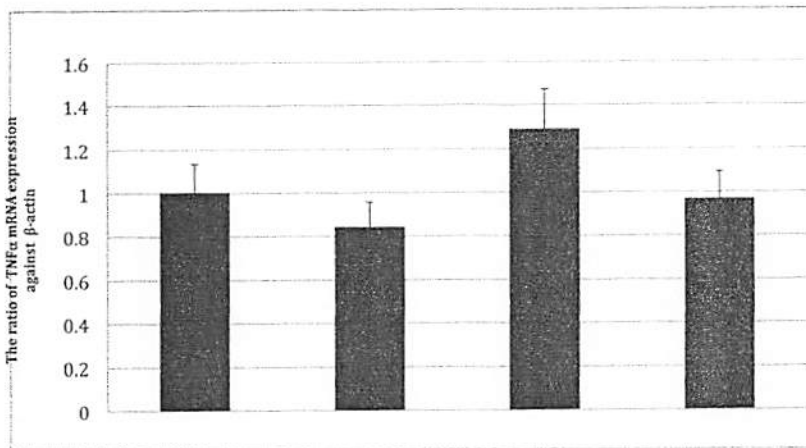
stimulation with *P. gingivalis* whole cells (10^8 colony-forming units/mL). To determine expression of IL-1 β mRNA, total RNA was extracted and real-time PCR was performed. The values represent the mean + SD of triplicate experiments. * $p < 0.01$, significantly lower than untreated cells (Student's t-test)



<i>P. gingivalis</i>	-	-	+	+
Kouboku	-	+	-	+

Figure 3

Figure 3. Inhibitory effect of Kouboku on enhancement of TLR2 mRNA expression stimulated with whole *Porphyromonas gingivalis* in OBA-9 12h. To study the inhibitory effect of Kouboku in OBA-9, Kouboku was added to subconfluent cultures of OBA-9, 30 min before stimulation with *P. gingivalis* whole cells (10^8 colony-forming units/mL). To determine expression of TLR2 mRNA, total RNA was extracted and real-time PCR was performed. The values represent the mean + SD of triplicate experiments.



<i>P. gingivalis</i>	-	-	+	+
Kampo A	-	+	-	+

Figure 4. Inhibitory effect of Kouboku on enhancement of TNF α mRNA expression stimulated with whole *Porphyromonas gingivalis* in OBA-9 12h. To study the inhibitory effect of Kouboku in OBA-9, Kouboku was added to subconfluent cultures of OBA-9, 30 min before stimulation

with *P. gingivalis* whole cells (10^8 colony-forming units/mL). To determine expression of TLR2 mRNA, total RNA was extracted and real-time PCR was performed. The values represent the mean + SD of triplicate experiments.

Discussion

References

- Asakawa R, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Goncalves RB, Izumi S, Fujiwara T, Nakano Y, Suzuki N, Uchida Y, Ouhara K, Shiba H, Taubman MA, Kurihara H, Sugai M. Outer membrane protein_100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol*. 2003 Nov;50(4):1125-39.
- Aspiras MB, Barros SP, Moss KL, Barrow DA, Phillips ST, Mendoza L, de Jager M, Ward M, Offenbacher S. (2013) Clinical and subclinical effects of power brushing following experimental induction of biofilm overgrowth in subjects representing a spectrum of periodontal disease. *J Clin Periodontol*. Dec;40(12):1118-25.
- Bosshardt DD, Lang NP. (2005) The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res*. Jan;84(1):9-20
- Choi WS, Lee TH, Son SJ, Kim TG, Kwon BM, Son HU, Kim SU, Lee SH (2017) Inhibitory effect of obovatol from *Magnolia obovata* on the Salmonella type III secretion system. *J Antibiot (Tokyo)*. Nov;70(11):1065-1069. doi: 10.1038/ja.2017.98. Epub 2017 Sep 6.
- Fujita T, Ashikaga A, Shiba H, Kajiya M, Kishimoto A, Hirata R, Tsunekuni N, Hirono C, Kawaguchi H, Shiba Y, Kurihara H. (2008) Irsogladine maleate counters the interleukin-1 beta-induced suppression in gap-junctional intercellular communication but does not affect the interleukin-1 beta-induced zonula occludens protein-1 levels in human gingival epithelial cells. *J Periodontol Res*. Feb;43(1):96-102.
- Fujita, T., Kishimoto, A., Shiba, H., Hayashida, K., Kajiya, M., Uchida, Y., Matsuda, S., Takeda, K., Ouhara, K., Kawaguchi, H., Abiko, Y., and Kurihara, H. (2010) Irsogladine maleate regulates neutrophil migration and E-cadherin expression in gingival epithelium stimulated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Biochemical pharmacology*79, 1496-1505
- Fujita, T., Yumoto, H., Shiba, H., Ouhara, K., Miyagawa, T., Nagahara, T., Matsuda, S., Kawaguchi, H., Matsuo, T., Murakami, S., and Kurihara, H. (2012) Irsogladine maleate regulates epithelial barrier function in tumor necrosis factor-alpha-stimulated human gingival epithelial cells. *Journal of periodontal research* 47, 55-61

Fujita T, Yoshimoto T, Kajiya M, Ouhara K, Matsuda S, Takemura T, Akutagawa K, Takeda K, Mizuno N, Kurihara H(2018) Regulation of defensive function on gingival epithelial cells can prevent periodontal disease. Jpn Dent Sci Rev. May;54(2):66-75.

Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, Drage MG, Jadowsky J, Harding CV, Weinberg A, Sieg SF. (2007) Human -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. Proc Natl Acad Sci U S A. Nov 20;104(47):18631-5

Hasegawa S, Yonezawa T, Ahn JY, Cha BY, Teruya T, Takami M, Yagasaki K, Nagai K, Woo JT. Honokiol inhibits osteoclast differentiation and function in vitro. Biol Pharm Bull. 2010;33(3):487-92.

Hellström MK1, Ramberg P. (2014) The effect of a dentifrice containing Magnolia extract on established plaque and gingivitis in man: a six-month clinical study. Int J Dent Hyg. May;12(2):96-102.

Imani H, Tabibi H, Najafi I, Atabak S, Hedayati M, Rahmani L. (2015) Effects of ginger on serum glucose, advanced glycation end products, and inflammation in peritoneal dialysis patients. Nutrition. May;31(5):703-7.

Inagaki S, Ishihara K, Yasaki Y, Yamada S, Okuda K. Antibody responses of (2003) periodontitis patients to gingipains of *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontol. Oct;74(10):1432-9.

Jeong SJ1, Lim HS2, Seo CS1, Kim JH3, Jin SE1, Yoo SR1, Shin HK4. (2015) Traditional herbal formula *Jakyakgamcho-tang* (*Paeonia lactiflora* and *Glycyrrhiza uralensis*) impairs inflammatory chemokine production by inhibiting activation of STAT1 and NF- κ B in HaCaT cells. Phytomedicine. 2015 Feb 15;22(2):326-32.

Kadowaki T, Nakayama K, Okamoto K, Abe N, Baba A, Shi Y, et al. (2000) *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. J Biochem 128:153-9.

Kawai, T., Paster, B. J., Komatsuzawa, H., Ernst, C. W., Goncalves, R. B., Sasaki, H., Ouhara, K., Stashenko, P. P., Sugai, M., and Taubman, M. A. (2007) Cross-reactive adaptive immune response to oral commensal bacteria results in an induction of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)-dependent periodontal bone resorption in a mouse model. Oral microbiology and immunology22, 208-215

Kelk P, Abd H, Claesson R, Sandström G, Sjöstedt A, Johansson A. (2011) Cellular and molecular response of human macrophages exposed to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin. Cell Death Dis. Mar 10;2:e126.

Kishimoto A, Fujita T, Shiba H, Komatsuzawa H, Takeda K, Kajiya M, Hayashida K, Kawaguchi H, Kurihara H. (2008) Irsogladine maleate abolishes the increase in interleukin-8 levels caused by outer membrane protein 29 from *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* through the ERK pathway in human gingival epithelial cells. vJ Periodontal Res. Oct;43(5):508-13.

Lee JH, Ahn J, Kim JW, Lee SG, Kim HP.(2015) Flavonoids from the aerial parts of *Houttuynia cordata* attenuate lung inflammation in mice. *Arch Pharm Res.* Mar 6.

Lee YS¹, Lee YJ¹, Park SN¹. Synergistic Antimicrobial Effect of *Lonicera japonica* and *Magnolia obovata* Extracts and Potential as a Plant-derived Natural Preservative. *J Microbiol Biotechnol.* 2018 Sep 20.

Li N, Zhang JY, Zeng KW, Zhang L, Che YY, Tu PF. (2012) Anti-inflammatory homoisoflavonoids from the tuberous roots of *Ophiopogon japonicus*. *Fitoterapia.* Sep;83(6):1042-5.

Miyagawa, T., Fujita, T., Ouhara, K., Matsuda, S., Kajiya, M., Hayashida, K., Imai, H., Yoshimoto, T., Iwata, T., Shiba, H., Abiko, Y., and Kurihara, H. (2013) Irsogladine maleate regulates the inflammatory related genes in human gingival epithelial cells stimulated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *International immunopharmacology* 15, 340-347

Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Shiba, H., Uchida, Y., Kawai, T., Sayama, K., Hashimoto, K., Taubman, M. A., Kurihara, H., and Sugai, M. (2006) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of beta-defensin and the 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells. *Infection and immunity* 74, 5211-5220

Petersen PE, Ogawa H. (2005) Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol.* Dec;76(12):2187-93

Peyyala R, Kirakodu SS, Novak KF, Ebersole JL, (2013) Oral epithelial cell responses to multispecies microbial biofilms. *J Dent Res.* 2013 Mar;92(3):235-40

Socransky SS, Haffajee AD. (1994) Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl.* :S684-5, 8-93; quiz S714-7.

Sánchez GA, Acquier AB, De Couto A, Busch L, Mendez CF. (2015) Association between *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque and clinical parameters, in Argentine patients with aggressive periodontitis. *Microb Pathog.* Mar 24;82:31-36.

Savitri, I. J., Ouhara, K., Fujita, T., Kajiya, M., Miyagawa, T., Kittaka, M., Yamakawa, M., Shiba, H., and Kurihara, H. (2014) Irsogladine maleate inhibits *Porphyromonas gingivalis*-mediated expression of toll-like receptor 2 and interleukin-8 in human gingival epithelial cells. *Journal of periodontal research*

Song X, Zhang W, Wang T, Jiang H, Zhang Z, Fu Y, Yang Z, Cao Y, Zhang N. (2014) Geniposide plays an anti-inflammatory role via regulating TLR4 and downstream signaling pathways in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. *Inflammation.* Oct;37(5):1588-98.

Teng YT, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, et al. (2000) Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal

infection. *J Clin Invest* ;106:R59-67.

Uchida Y, Shiba H, Komatsuzawa H, Hirono C, Ashikaga A, Fujita T, Kawaguchi H, Sugai M, Shiba Y, Kurihara H. (2005) Irsogladine maleate influences the response of gap junctional intercellular communication and IL-8 of human gingival epithelial cells following periodontopathogenic bacterial challenge. *Biochem Biophys Res Commun*. Jul 29;333(2):502-7.

Valéria Gelani, Ana Paula Fernandes, Thais Helena Gasparoto, Thiago Pompermaier Garlet, Tânia Mary Cestari, Hayana Ramos Lima, et al. (2009) The Role of Toll-Like Receptor 2 in the Recognition of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontol*. Dec;80(12):2010-9. December 2009, Vol. 80, No. 12, Pages 2010-2019.

Wang Q, Dziarski R, Kirschning CJ, Muzio M, Gupta D. (2001) Micrococci and peptidoglycan activate TLR2-->MyD88-->IRAK-->TRAF-->NIK-->IKK-->NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infect Immun*. Apr;69(4):2270-6.

Yoshimura K, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y. (2002) Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* are antagonists for human toll-like receptor 4. *Infect Immun*. Jan;70(1):218-25.

F. Manuscript of Journal International

Esthetic consideration in patient management with severe chronic periodontitis aggravated by oral dexamethasone

I.J. Savitri¹, O.Arief², M N Fallah³

¹ Department of Periodontology, Faculty of Dental Medicine, Univeristas Airlangga. Jl. Prof. Dr. Moestopo no. 47. Surabaya. Indonesia

² Periodontology Specialist Program, Faculty of Dental Medicine, Univeristas Airlangga, Jl. Prof. Dr. Moestopo no. 47. Surabaya. Indonesia.

³ Undergraduate student, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga. Jl. Prof. Dr. Moestopo no. 47. Surabaya. Indonesia.

Abstract

More than 80% of population in the world suffers from periodontitis. Chronic periodontitis caused by the periodontopathogenic bacteria against host immune system and may lead tooth lost in oral cavity. Steroidal inflammatory drugs, Dexamethasone, reported inhibits the production of some inflammatory cytokines activated by LPS and diminishing macrophage activation that caused more tissue break down. Furthermore, another steroidal inflammatory drugs, cetirizine dihydrochloride were given to replace dexamethasone. Cetirizine dihydrochloride were reported had opposite effect compared with dexamethasone. In other hands, the tooth loss at the anterior area may follow by psychological issue in some patient.

This study reports the esthetic consideration in patient management of severe chronic periodontitis aggravated by oral dexamethasone. It will also discuss the effect of dexamethasone and cetirizine dihydrochloride in periodontal tissue.

Introduction

Periodontitis is an inflammatory disease caused by microorganism and characterized by progressive destruction in periodontal tissue (Socransky, 1994). Chronic periodontitis, is a common disease in oral cavity consisting of slow irreversible damage of periodontal supporting tissue in a period of time¹. It has been shown that deep periodontal pockets as a results of alveolar bone destruction have been associated with the increase in the number of tooth loss¹. The tooth loss, especially at the anterior area, lead to psychological issue in some patient¹.

The pathogenesis of destructive periodontal disease is currently understood as the response given by an individual to the bacterial challenge of subgingival dental biofilm².

This response is modulated by different mechanisms, including environmental and acquired factors². Studies have analyzed the role of steroidal inflammatory drugs in the pathogenesis of destructive periodontal disease². Dexamethasone is steroidal inflammatory drugs, may inhibits the production of some inflammatory cytokines activated by LPS and diminishing macrophage activation that caused more tissue breakdown².

This study reports the esthetic consideration in patient management of severe chronic periodontitis aggravated by oral dexamethasone.

Case report

A 44-year-old female, systemically healthy, have seafood allergic, nonsmoker patient was diagnosed generalized severe chronic periodontitis. Since 2 years ago, patient consumed oral dexamethasone periodically to prevent allergic reaction. The periodontal family history of the patient did not reveal any severe periodontal destruction or early tooth loss, and there were not external abnormalities found (fig. 1). The patient did not receive any periodontal treatment previously. The patient expressed her concern about aesthetics.

Extra oral and intra oral image with periodontal chart and radiographic of the patient were taken before periodontal therapy. The oral examination showed severe calculus and teeth mobility in several area were measured by using Miller's tooth mobility index.³ Three degree of Miller's index were found in upper right and left central incisor, 2 degree were found in teeth 44, 43, 42, 41, 31, 32 and 1 degree were found in teeth 33, 34, 35. Gingival recession and periodontal pocket up to 9mm were found in

most of the teeth (fig. 2 and fig. 3). Radiograph examination revealed severe bone loss in upper right and left central incisor. Bone loss also occurs in other areas (fig.4).

Initial periodontal therapy was planned followed by extraction of the tooth, socket preservation and immediate denture on 11 and 21. Metal frame combined with acrylic denture were designed to support the tooth splint and replace the teeth on mandible⁴. To modulate immune system, the patient was treated with host modulation therapy⁵. Periodontal flap surgery combined with bone graft augmentation was planned to regenerate periodontal tissue. In addition, patient referred to internist to replace steroidal inflammatory drugs.



Figure 1. Extra oral image of the patient

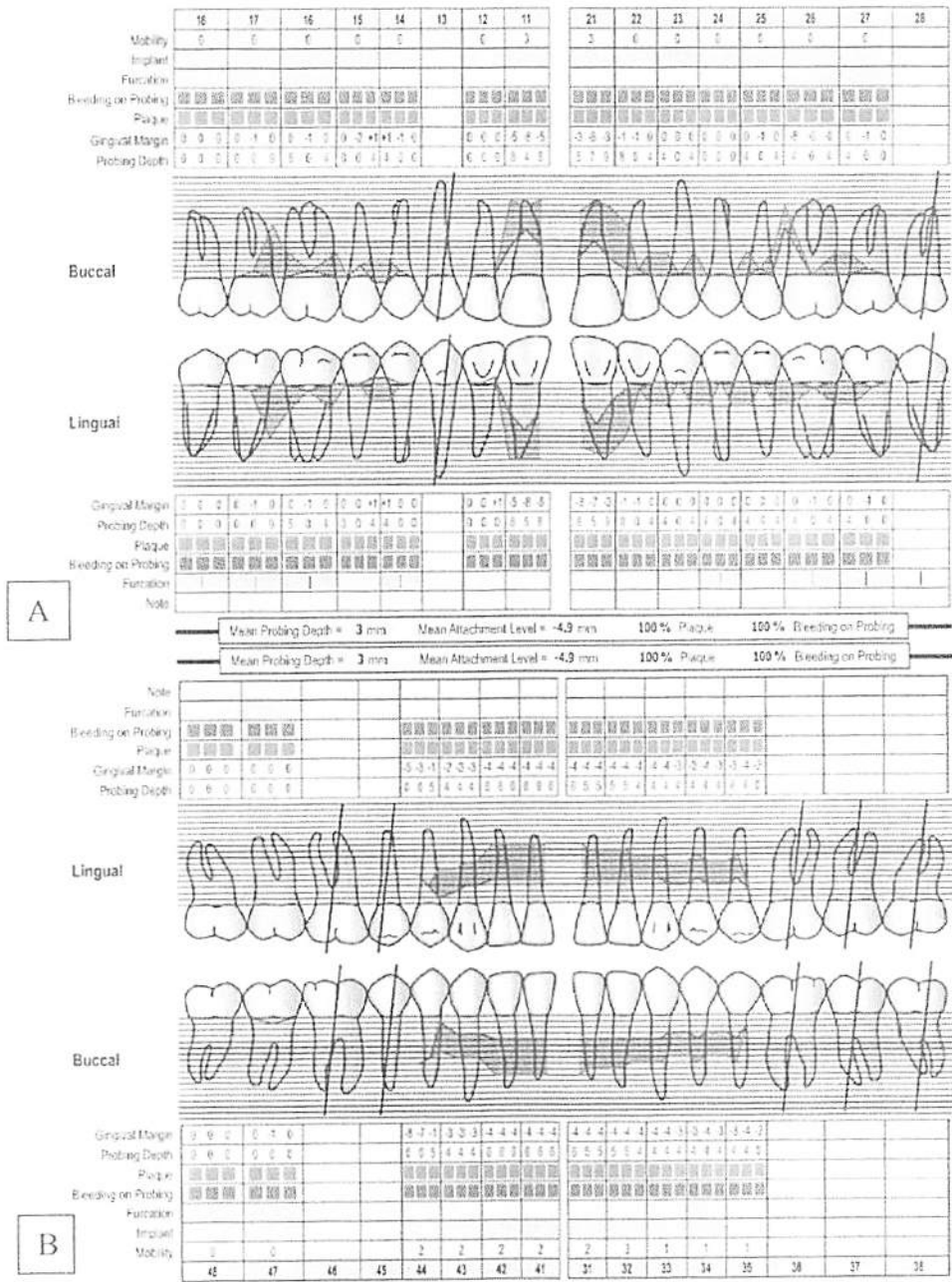


Figure 2. Periodontal chart (A) upper arch (B) lower arch

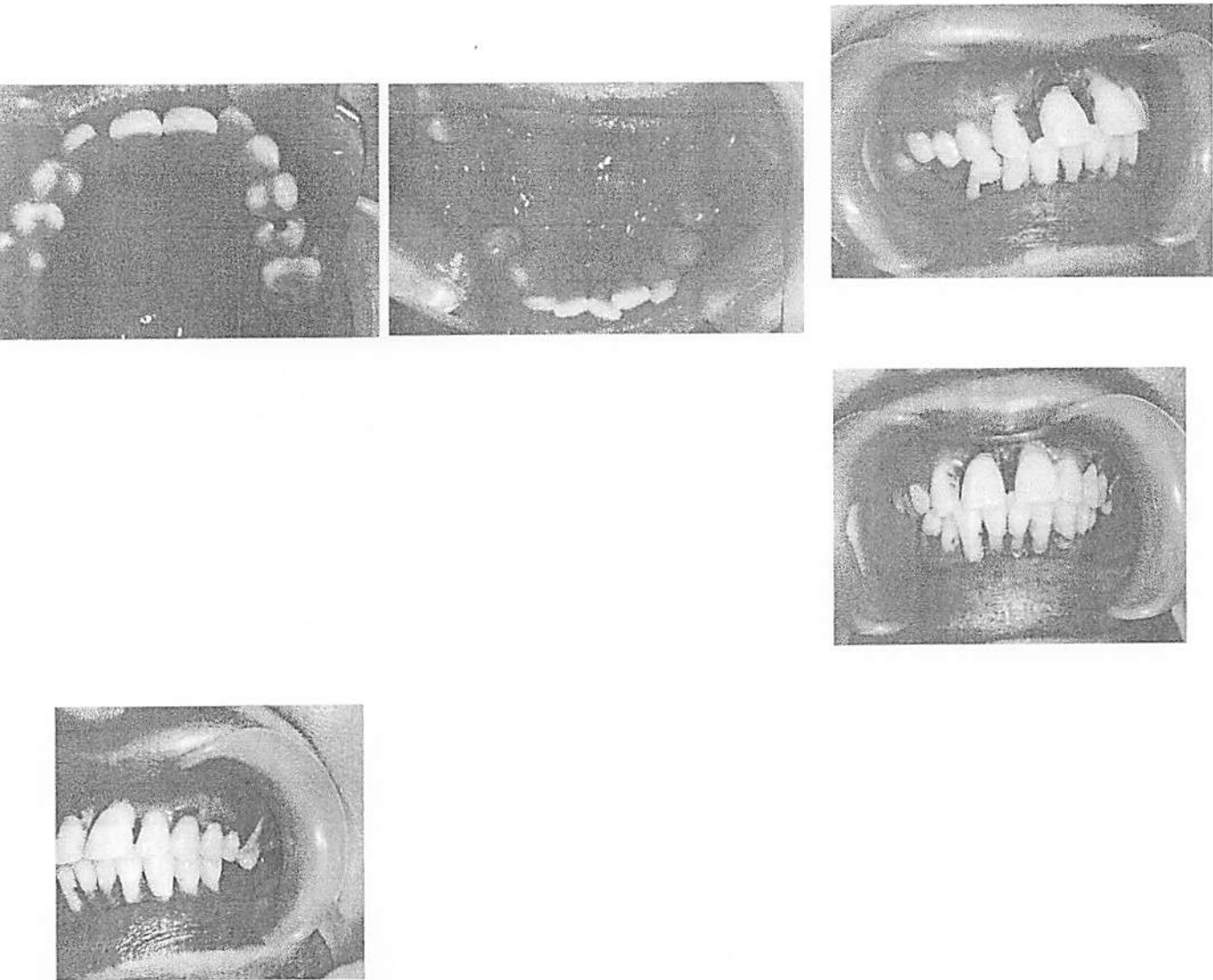
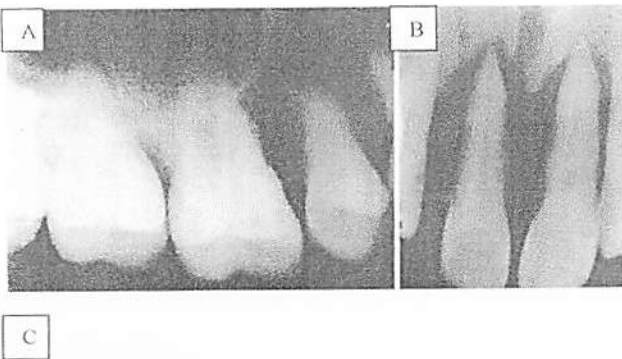


Figure 3. Intra oral image of the patient



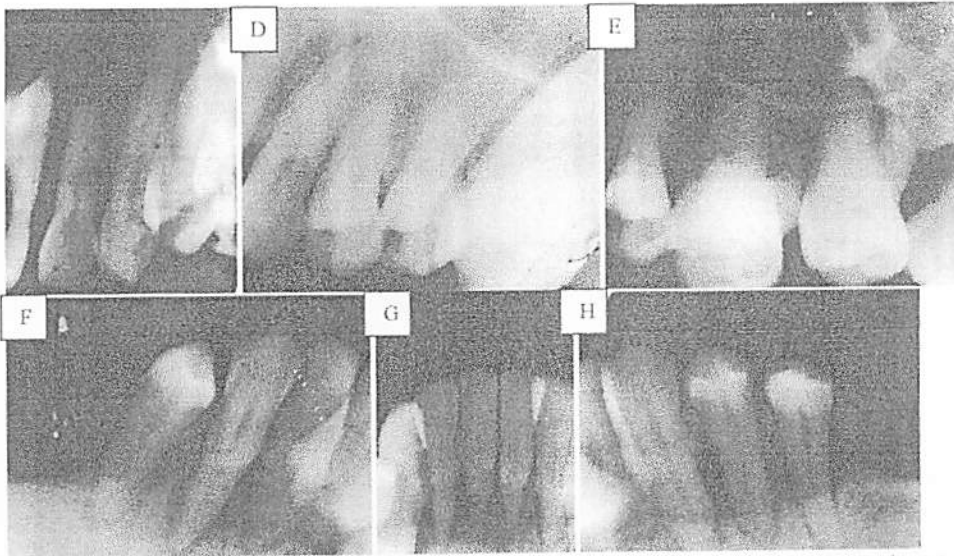


Figure 4. (A) X-ray image teeth 17, 16, 15; (B) X-ray image teeth 11, 21; (C) X-ray image teeth 2, 2, 2, 3, 24; (D) X-ray image teeth 23, 24, 25; (E) X-ray image teeth 25, 26, 27; (F) X-ray image teeth 44, 43, 42; (G) X-ray image teeth 42, 41, 31, 32; (H) X-ray image teeth 33, 34, 35

Case management

At the first visit, patient was treated by scaling, root planning and fiber splint on teeth 44, 43, 42, 41, 31, 32, 33, 34, 35 (fig. 5 and fig. 6). Immediate denture for maxilla and metal frame denture for mandible were designed (fig. 7). Patient was given doxycycline 20 mg twice a day for three months as host modulation therapy and patient referred to internist for medical assessment.

Laboratory assessment show the fasting glucose level was 89 mg/dl (normal: 70-115 mg/dl) and 2-hours glucose level was 135 mg/dl (normal: <200 mg/dl), HBA1C was 4,5 % (normal: 5,7%; pre diabetes: 5,7-6,4%; diabetes: \geq 6,5%). Dexamethasone was replaced with another anti-histamine, *cetirizine dihydrochloride*, to prevent allergic reaction.

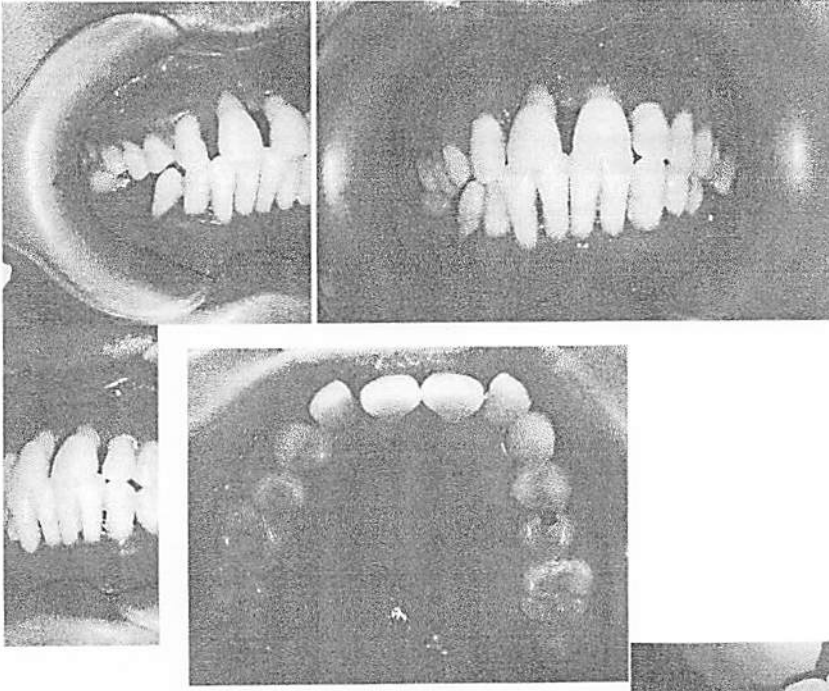


Figure 5. Intra oral image after scaling and root planning

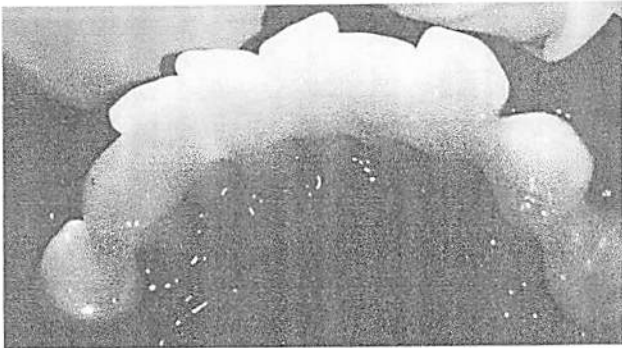
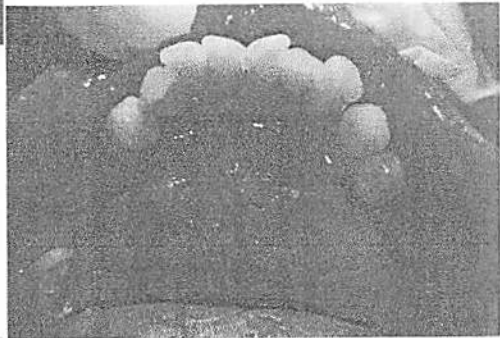


Figure 6. Fiber splint on tooth 34, 33, 32, 31, 41, 42, 43, 44, 45

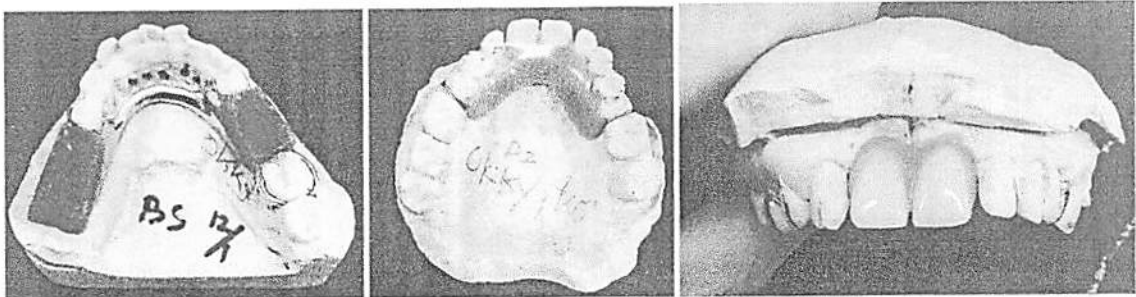


Figure 7. Lower arch metal frame design and immediate denture tooth 11 and 21

At the second visit, one week after splinting, patient came to control her condition and continued the treatment. There was an abscess on 34, 33, 32, 31, 41, 42, 43, 44, 45. Plaque and debris found in oral cavity (fig. 8). Amoxicillin combined with metronidazole and oral hygiene instruction was given to the patient for abscess treatment. Metal frame was tried on mandible and occlusion was adjusted (fig. 9).



Figure 8. Periodontal abscess in tooth 3.4,3.3,3.2,3.1,4.1,4.2,4.3,4.4,4.5

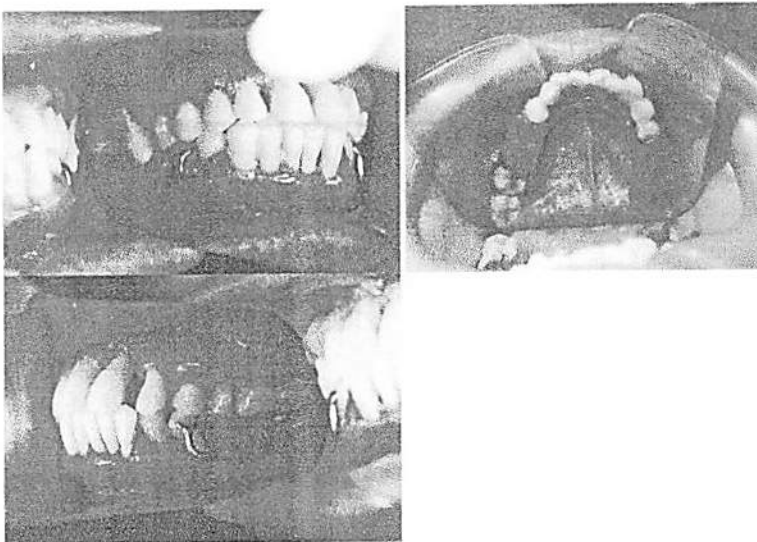


Figure 9. Fitting the metal frame and searching the bite for denture

At the third visit, abscess was healing in 34, 33, 32, 31, 41, 42, 43, 44, 45 (fig. 10). Surgical treatment, socket preservation in tooth 11 and 21, was approach and metal frame was inserted to replace teeth loss on mandible.

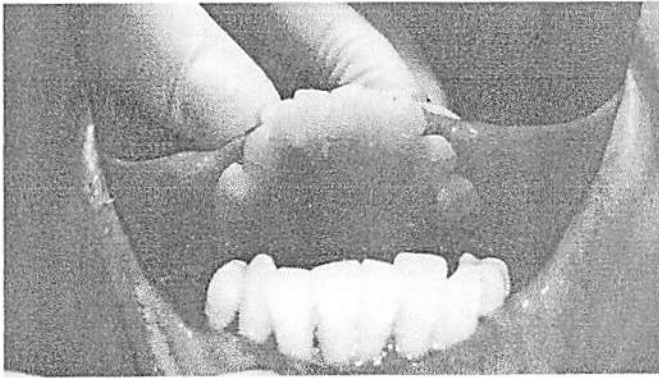
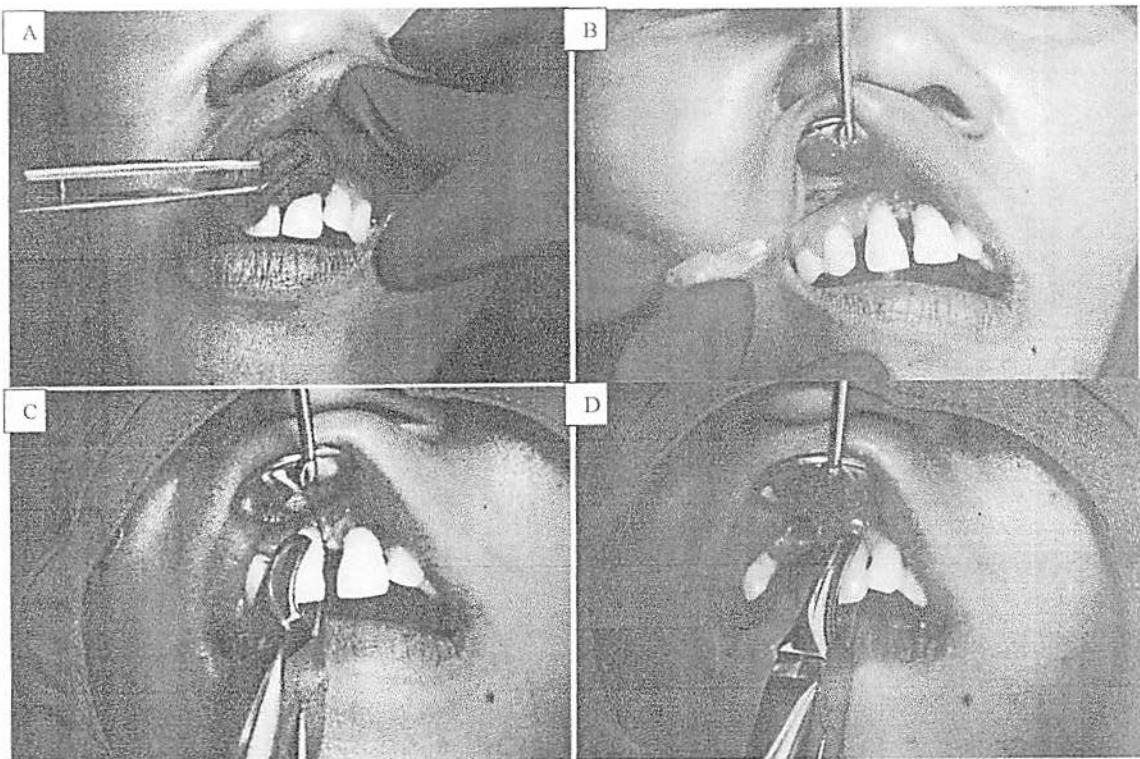
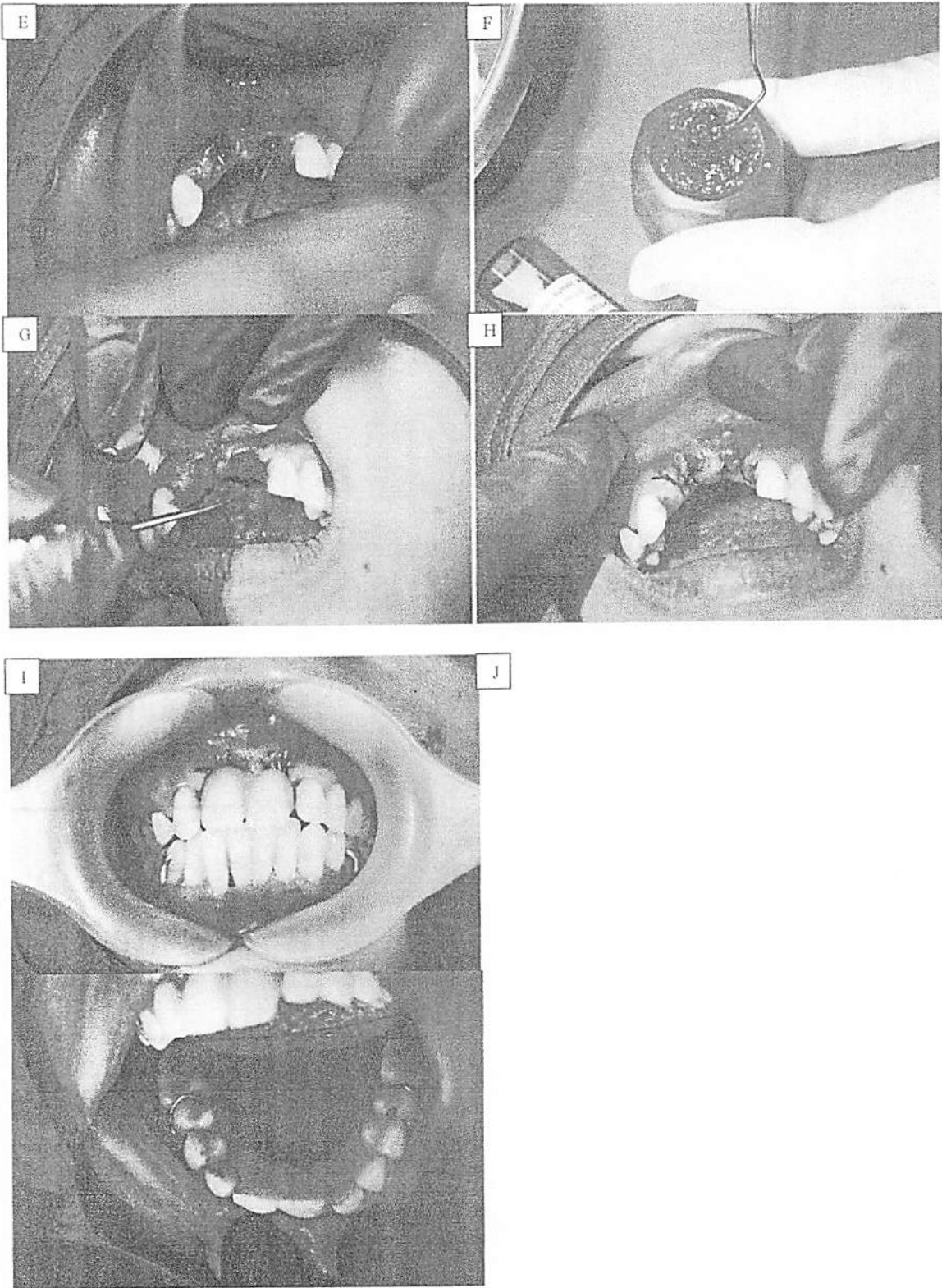


Figure 10. Abscess healing in tooth 34, 33, 32, 31, 41, 42, 43, 44, 45

Socket preservation 11, 21 followed by immediate denture carried out under local anesthetic drug and removable metal frame was inserted. Surgical steps were explained briefly in figure 11.





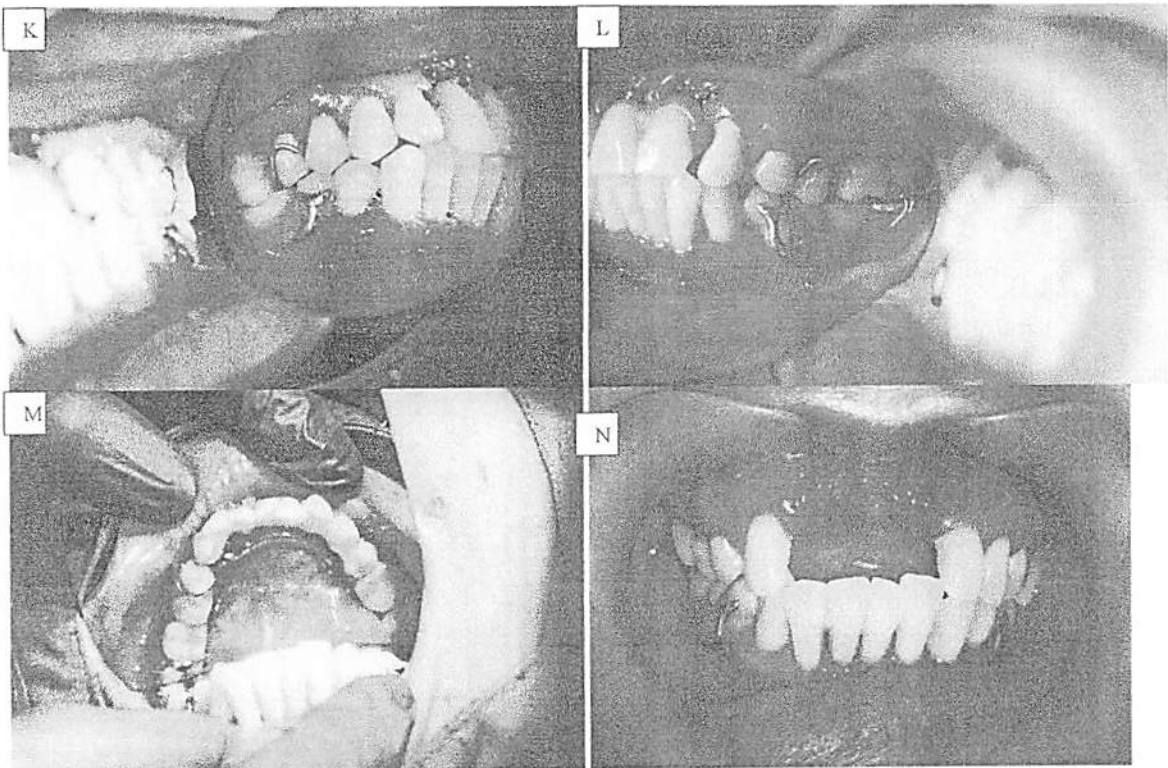


Figure 11. (A) Asepsis technique using povidone iodine to prevent infection (B) Surgery was carried out under anesthetic drug, mepivacaine 2% with epinephrine 1:100.000 (Scandonest 2% Special) (C) The extraction of 11 (D) The extraction of 21 (E) socket debridement of 11 and 21 (F) PRF was mixed with bone graft (Batan Research Tissue Bank) (G) bone graft application in socket 11 and 21 (H) The socket was sutured with braided non-absorbable silk 4.0 (Mersilk) (I) Buccal side of immediate denture 11 and 21 (J) Occlusal side of immediate denture 11 and 21 (K) and (L) Sagittal view removable metal frame partial denture on mandible (M) Occlusal view removable metal frame partial denture on mandible (N) The wound healing after 2 weeks socket preservation surgery.

Discussion

This case presents the aesthetic consideration in patient management with severe chronic periodontitis. Loss of anterior teeth particularly in adolescents increased demand for tissue maintenance and esthetic.⁶ The hopeless teeth substitution using denture in one visit could give solution for patient. Some previous studies reported the alternative treatment of single visit replacement of central maxillary were immediate denture⁷ and fiber-reinforced composite resin.⁶

Since the chronic periodontitis cause the tissue destruction and tooth mobility, the treatment started with teeth splinting of 34, 33, 32, 31, 41, 42, 43, 44, 45 to maintain the stability of abutment. Carlsson et al (1965) suggested splinting primary abutment teeth to withstand the forces of the removable partial denture. They recommend based on the observation during 4-year of clinical study, no deterioration of the periodontal condition occurred on the splinted abutments. Goodkind made the same suggestion.⁸

Metal frame removable partial denture is the ideal prosthesis for patient with periodontal problem⁴. They give better stability because of the rigidity. This prosthesis could prevent mesial and distal displacement of teeth, lateral pressure, and prevent dental extrusion. Furthermore, removable partial denture made from metal frame return the efficiency of overall mastication. They might divide masticatory load and give stabilization force with splint mechanism so that the natural teeth can function well.⁴

Socket preservation in tooth 11 and 21 was performed with demineralized freeze dried bone xenograft (DFDBX) (Batan Research Tissue Bank) and platelet rich fibrin (PRF). Xenograft in socket preservation techniques delayed the socket healing. However it will help conserving anatomy of the bone. Xenografts are considered the most used bone fillers in the socket preservation procedures due to their osteo-conductive matrix framework that enhances the growth of new bone around it.⁹

PRF consists of an autologous leukocyte-platelet-rich fibrin matrix, composed of a tetra molecular structure, with cytokines, platelets, and stem cells within it. PRF acts as a biodegradable scaffold that favors the development of micro vascularization and able to guide epithelial cell migration to its surface. PRF has great potential for bone and soft tissue regeneration without inflammatory reactions and may be used alone or in

combination with bone grafts. The advantages of these techniques are promoting homeostasis, enhance the bone growth and maturation.¹⁰

The patient was referred to internist due to suspect of systemic problem that may cause severe bone and clinical attachment lose in many teeth. Dexamethasone was replaced by cetirizine dihydrochloride. Dexamethasone may cause impair wound healing and diminish bone mineralization. Experimental study in animal periodontal model revealed dexamethasone cause more attachment loss and made a bone more easily fractured as compared to controls. Anti-inflammatory effect from dexamethasone can minimize clinical signs of inflammation at first by reducing host response. Impaired host response could be responsible for more tissue breakdown.²

Furthermore, dexamethasone down regulates osteocalcin in bone cells through leptin pathway. Dexamethasone could downregulate the osteogenic markers including Runt-related transcription factor 2 (RunX2), alkaline phosphatase and osteocalcin. In addition, Dexamethasone induces histone deacetylase (HDAC6) expression that binds to glucocorticoid receptor and may inhibit the expression of osteocalcin.¹¹

Cetirizine dihydrochloride is an antihistamine used to relieve allergy symptoms such as watery eyes, runny nose, itching eyes/nose, sneezing, hives, and itching. It works by blocking histamine that body makes during an allergic reaction. Adverse effect profile of cetirizine generally being of mild to moderate intensity to be comparable with other antihistamine like astemizole, ebastine, fexofenadine, loratadine, mizolastine or terfenadine.¹²

Cetirizine is an antagonist of TLR2 and TLR4 receptor. The suppressive effect on TLR2 and TLR4 will decrease the production of IL-8 as pro-inflammatory cytokine and

CCL20 as macrophage inflammatory protein. This experiment confirmed the addition of cetirizine one hour before stimulation in human gingival fibroblast by using TLR2 and TLR4 ligand and histamin downregulate the production of IL-8 and CCL20. Beside TLR2 and TLR4, cetirizine also block histamine link with histamine-1 receptor (H1R) in human gingival fibroblast.¹³

We assumed dexamethasone and cetirizine show different effect in periodontal tissue. The mechanism of action these steroidal anti-inflammatory drugs still remain unclear. Dexamethasone cause bone destruction in animal periodontal model. In other hands, cetirizine may regulate inflammatory process in human gingival cells. Further study will be needed to discuss the effect of steroidal anti-inflammatory drug in periodontal tissue. However, we suggest cetirizine dihydrochloride gives ideal treatment for allergic in patients with periodontal disease.

Doxycycline 20 mg twice a day for three months is a subantimicrobial-dose doxycycline. Doxycycline was the most potent tetracycline in the inhibition of collagenolytic activities. Golub et.al. in 1990 reported that this property of doxycycline provided the pharmacological rationale for the use of a low or subantimicrobial dose of doxycycline, which was shown to be efficient in inhibiting mammalian collagenase activity without developing antibiotic resistance.¹⁴

Conclusion

It can be concluded the treatment of severe chronic periodontitis involved modulating host-immune response and local factor. Nevertheless, the esthetic should be considered by the operator, In this case, the modulation of host-immune response can reduce periodontal tissue breakdown cause by dexamethasone. Local factor such as plaque,

calculus and trauma occlusion can worsen periodontal tissue breakdown. Because of that, modulating host-immune response and local factor are very important for treatment of severe chronic periodontitis.

References

1. Agrali O B, Kuru B E. 2015. Periodontal treatment in a generalized severe chronic periodontitis patient: A case report with 7-year follow-up. *Eur J Dent*; 9(2): 288-292.
2. Cavagni J, Soletti A C, Gaio E J, Rosing C K. 2005. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Braz Oral Res*; 19(4): 290-4.
3. Wu C P, Tu Y K, Lu S L, Chang J H, Lu H K. 2018. Quantitative analysis of Miller mobility index for the diagnosis of moderate to severe periodontitis- A cross-sectional study. *Journal of Dental Sciences* (2018); 13:43-47.
4. Carranza F A. *Glickman's clinical periodontology*. Sixth ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1984. p.906-44
5. Ipshita S, Kurian I G, Dileep P, Guruprasad C N, Singh P, Pradeep A R. 2017. Host modulation therapy: An updated review. *Journal of Advanced Clinical and Research Insights* (2017);4: 55-58.
6. Muhamad A H, Azzaldeen A, Nezar W. 2017. Single Visit Replacement of Central Maxillary Using Fiber-Reinforced Composite Resin. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS)*; Volume 16, Issue 3 Ver.XI (March.2017), PP 69-74.
7. Caputi S, Murmura G, Ricci L, Varvara G, Sinjari B. 2013. Immediate denture fabrication: a clinical report. *Annali di Stomatologia* 2013; IV (3-4):273-277.
8. Petridis H, Hempton T J. 2001. Periodontal Considerations in Removable Partial Denture Treatment: A Review of the Literature. *Int J Prosthodont*; 14:164-172.
9. Mendez C A S, Lang N P, Caneva M, Lemuz G R, Solano G M, Botticelli D. 2017. Comparison of allografts and xenografts used for alveolar ridge preservation. A clinical and histomorphometric RCT in humans. *Clin Implant Dent Res*. 2017;1-8.
10. Borie E, Olivi D G, Orsi I A, Garlet K, Weber B, Beltran V, Fuentes R. 2015. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int J Clin Exp Med*; 8(5):7922-7929.
11. Chen S M, Peng Y J, Wang C C, Su S L, Salter D M, Lee H S. 2018. Dexamethasone Down-regulates Osteocalcin in Bone Cells through Leptin Pathway. *International Journal of Medical Sciences* 2018; 15(5):507-516
12. Zhang L, Cheng L, Hong J. 2013. The clinical use of Cetirizine in the Treatment of Allergic Rhinitis. *Pharmacology* 2013; 92:14-25.
13. Dommisch H, Chung W O, Plotz S, Jepsen S. 2015. Influence of histamine on the expression of CCL20 in human gingival fibroblasts. *J Periodont Res* 2015; 50:786-792.

14. Elavarasu S, Sekar S, Murugan T. 2012. Host modulation by therapeutic agents. J Pharm Bioallied Sci; 4(Suppl2): S256-S259.