

Research Report

Identifikasi protein pada granuloma periapikal dengan metode SDS - PAGE

(The identification of periapical granuloma protein using SDS - PAGE method)

Anissa Alda Germanyta¹, Edhi Jularso² and Theresia Indah Budhy²

¹Student of Dentistry, Faculty of Dentistry, Airlangga University, Surabaya

²Department of Oral Pathology and Maxillofacial, Faculty of Dentistry, Airlangga University, Surabaya

ABSTRACT

Background. *Periapical granuloma is a periapical inflammatory lesion that occurs for a long time and goes along with periapical bone resorption. Purpose.* This study aims to determine the variety of protein with kilodalton (kDa) molecular weight that was identified in periapical granulomas using SDS PAGE. **Method.** This study is a descriptive exploratory study using a cross sectional study design. **Results.** The results showed protein bands were detected in relative molecule mass in 8.483 kDa; 12.130 kDa; 54.308 kDa; 58.139 kDa; 21.925 kDa; 175.388 kDa; 45.304 kDa; 67.531 kDa; 31.423 kDa; 27.444 kDa; 17.513 kDa; 14.067 kDa; and 4.717 kDa. **Conclusion.** The molecular weight of the protein contained in periapical granuloma was 8.483 kDa; 12.130 kDa; 54.308 kDa; 58.139 kDa; 21.925 kDa; 175.388 kDa; 45.304 kDa; 67.531 kDa; 31.423 kDa; 27.444 kDa; 17.513 kDa; 14.067 kDa; and 4.717 kDa.

Keywords: *Periapical granuloma, protein, SDS – PAGE*

ABSTRAK

Latar belakang. Granuloma periapikal adalah lesi inflamasi periapikal yang berlangsung dalam waktu yang lama dengan resorpsi tulang periapikal **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis protein dengan berat molekul kilodalton (kDa) yang diidentifikasi pada granuloma periapikal dengan metode SDS PAGE. **Metode.** Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif deskriptif. menggunakan rancangan *crosssectional study*. **Hasil.** Hasil penelitian menunjukkan pita-pita protein pada masa molekul relatif terdeteksi yaitu 8,483 kDa; 12,130 kDa; 54,308 kDa; 58,139 kDa; 21,925 kDa; 175,388 kDa; 45,304 kDa; 67,531 kDa; 31,423 kDa; 27,444 kDa; 17,513 kDa; 14,067 kDa; dan 4,717 kDa. **Simpulan.** Berat molekul protein yang terkandung dalam granuloma periapikal yaitu 8,483 kDa; 12,130 kDa; 54,308 kDa; 58,139 kDa; 21,925 kDa; 175,388 kDa; 45,304 kDa; 67,531 kDa; 31,423 kDa; 27,444 kDa; 17,513 kDa; 14,067 kDa; dan 4,717 kDa.

Kata Kunci: Granuloma Periapikal, protein, SDS-PAGE

Korespondensi (*correspondence*): Anissa Alda Germanyta, Bagian Patologi Mulut dan Maksilofasial, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47, Kampus A, Jawa Timur 60286, Indonesia. E-mail: anissaaldag@gmail.com

PENDAHULUAN

Karies gigi merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh demineralisasi email dan dentin.¹Karies yang tidak mendapatkan perawatan akan berlanjut mencapai pulpa dan mengakibatkan peradangan pada pulpa. Keadaan berlanjut bila invasi bakteri karies telah meluas. Apabila faktor penyebab peradangan pulpa tidak dihilangkan maka secara progresif akan

menyebabkan nekrosis pulpa yang akan berlanjut ke jaringan periapikal.²

Inflamasi granuloma yaitu bentuk dari inflamasi kronik yang ditandai adanya makrofag aktif yang menyerupai gambaran sel skuamosa atau biasa disebut epiteloid, kemudian sel – sel tersebut berproliferasi membentuk suatu jaringan spesifik yang disebut granulomatus.³

Tekanan dalam jaringan granulasi membesar sehingga menekan jaringan sehat serta tulang di

sekitarnya, akibatnya terjadi resorpsi tulang. Pembentukan jaringan granulomatus mengakibatkan sel yang berada di tengah masa epiteloid tidak mendapatkan suplai nutrisi.⁴

Granuloma periapikal adalah produk lesi inflamasi kronis pada apeks gigi non-vital, yang terdiri dari jaringan granulasi.⁵ Granuloma periapikal dapat berkembang menjadi kista radikuler. Pembentukan kista terjadi sebagai hasil proliferasi epiteloid yang membantu memisahkan stimulus inflamasi (nekrosis pulpa) dari tulang sekitarnya.⁶ Pada tahap awal proses pembentukan kista, *epitel rest of malassez* (ERM) di ligamen periodontal berproliferasi akibat peradangan di granuloma periapikal. Faktor yang memicu peradangan adalah endotoksin bakteri yang berasal dari pulpa yang mati.⁷ Perubahan dental granuloma menjadi kista radikuler di regulasi oleh beberapa faktor seperti protein albumin yang kuantitasnya lebih besar daripada protein lainnya. Laporan Shear 2007 cit. Toller 1966 didapatkan bahwa albumin dengan berat molekul 69 kDa banyak ditemukan di kista rahang.⁸

Pada granuloma periapikal ditemukan banyak makrofag. Makrofag merupakan sel inflamasi yang dominan ketika digunakan sebagai antibodi monoklonal. Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa makrofag melebihi jumlah T-limfosit di dapatkan pada granuloma periapikal.⁹ Makrofag yang ditemukan di granuloma periapikal berfungsi sebagai fagosit untuk mencegah penyebaran bakteri secara efektif akibat dari infeksi saluran akar. Makrofag dianggap sebagai sumber utama sitokin IL-1 α IL-1 β dan TNF- α , yang berkontribusi untuk inisiasi dan proses regulasi inflamasi. Chandra (2011) menyebutkan bahwa protein yang terkandung pada IL-1 β dengan berat molekul 17 kDa, IL-4 dengan berat molekul 17 kDa, IL-8 dengan berat molekul 11 kDa, IL-10 dengan berat molekul 20 kDa dan TNF- α dengan berat molekul 26 kDa.¹⁰

Berdasarkan latar belakang diatas peneliti ingin menemukan protein yang terkait dengan granuloma periapikal yang dapat dijadikan sebagai penelitian pendahuluan dengan cara mengidentifikasi berat molekul protein dari jaringan granuloma periapikal yang diperiksa menggunakan SDS page.

BAHAN DAN METODE

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri, alumunium foil, *scalpel*,

blade, glove, pinset, sentrifus, mikrotube, *microtip*, pipet *appendorf*, freezer -80°C, *Vortex*, timbangan digital, *spektrofotometer*, gelas ukur, gelas baker, spatula. Perangkat *electrophoresis equipment* (SDS-PAGE), *trans blotter* (Bio-rad), grinder, kertas *whatmann*, *waterbath shaker*, *membran nitroselulose*, *chamber* untuk running SDS – PAGE (Biometra).

Bahan yang digunakan dalam penelitian SDS-PAGE adalah NaCl Fisiologis, larutan *stacking gel* 4% terdiri dari Acrylamid 30% 0,5M Tris HCl pH 6,8, 10% SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*), Akuabidest, TEMED, 10% APS. Larutan *separating gel* 12% terdiri dari 30% acrylamid, 1,5 m Tris-HCl pH 8,8, 10% SDS, Akuabides, TEMED, 10% APS, butanol, Elektroforesis Buffer terdiri dari glycin, Tris Base, SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*), akuadest. Laemmli buffer terdiri dari 2,5ml 1 M Tris Hcl pH 6,8, 0,5ml dd H₂O, 1gr SDS, 0,8ml 0,1 Bromophenol blue, 4ml 100% glycerol. 2ml 14,3M β -Mercuptethanol. Pewarnaan *coommasie brilliant blue* terdiri dari *coommasie blue*, *Acetid acid absoluted*, *metanol absoluted*, akuadest. Pencucian dengan larutan destaining terdiri dari *Acetid acid absoluted*, *metanol absoluted*, akuadest.

Jenis penelitian ini adalah eksploratif deskriptif untuk mengidentifikasi protein pada granuloma periapikal. Granuloma periapikal diambil dari jaringan periapikal hasil pencabutan gigi pasien dengan karies profunda. Selanjutnya sampel tersebut di haluskan dengan grinder kemudian sampel dilarutkan dalam larutan *Phosphat Buffer Saline* (PBS). Selanjutnya disonikasi dengan sonikator pada frekuensi 35 kHz dengan pola 10 x 30 detik dengan interval istirahat selama 1 menit dalam keadaan suhu dingin. Lalu sampel disentrifugasi menggunakan sentrifus dengan kecepatan 2.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C untuk mengendapkan agar protein yang terlarut bisa terpisah. Pelet dan supernatan suspensi tersebut dipisahkan. Supernatan hasil sentrifus yang mengandung protein diambil menggunakan pipet, sedangkan endapan yang berbentuk *pellet* di buang. Selanjutnya konsentrasi protein dihitung dengan nano drop spektrofotometer. Supernatan yang dihasilkan disimpan dalam freezer -80°C dan siap digunakan untuk SDS-PAGE.

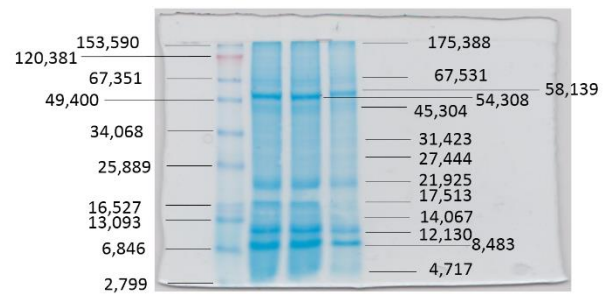
Cara analisis protein yang digunakan dalam teknik ini pertama yaitu *separating gel* 12% yang memiliki komposisi *acrylamid* 3,125 ml; 1,5 m

Tris-HCl pH 8,8, 10% SDS, Akuabides, TEMED, 10% APS, dan kedua *stacking gel* 4% terdiri dari Acrylamid 30% 0,5M Tris HCl pH 6,8, 10% SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*), Akuabidest, TEMED, 10% APS. Bahan *separating gel* 12% dimasukkan kedalam *gel plate* dengan posisi vertikal. Bagian atas dari *gel plate* yang telah tercampur larutan *separating gel* 12% diberi air atau butanol untuk membuat permukaannya rata, setelah itu butanol dibuang dan dibilas dengan PBS selanjutnya dikeringkan dengan kertas *Whatmann*. *Gel plate* yang telah mengering tambahkan larutan *stacking gel* 4% dengan komposisi kemudian comb dimasukkan. *Gel plate* yang telah mengeras, selanjutnya *comb* dilepaskan dan pasang *gel plate* dengan minigel Twin G-24 *slab* (Biometra). Mini gel yang terpasang dengan *gel plate* direndam dalam buffer elektroforesis, diusahakan tidak ada gelembung udara terutama dibawah *gel plate* agar hasilnya sempurna. Sampel di ambil sebanyak 7,5 μ untuk dicampur dengan *laemmli buffer* dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya, didenaturasikan dengan cara dipanaskan di dalam *waterbath* bersuhu 100°C selama lima menit. Sampel yang sudah didenaturasi sebanyak 15 μ dimasukkan ke dalam sumuran *stacking gel*. Selanjutnya *running* elektroforesis diaktifkan dengan tegangan 100 V dan kuat arus 40 MA, proses *running* kurang lebih 1 jam. Proses *running* dihentikan bila warna biru yang terawal turun dan telah sampai pada dasar gel. Gel kemudian diwarnai dengan *coomassie brilliant blue* selama 30 menit. Gel yang telah terwarnai selanjutnya dimasukkan dalam larutan asam asetat 10%.

Hasil *running gel* telah didapat kemudian lakukan proses pencucian pada *gel*. Pencucian *gel* dilakukan dalam 3 tahap, antara lain: Pencucian pertama menggunakan 25 ml metanol 50%; 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 71,25 ml akuades selama 30 menit. Pencucian kedua menggunakan 2,5ml metanol 5%; 3,75 ml asam asetat 7,5% dan 71,25 ml akuades selama 20 menit. Pencucian ketiga menggunakan glutaraldehida 10% dan 90ml akuadest selama 25 menit. Gel dicuci untuk menghilangkan larutan *destaining* dan gel disimpan dalam larutan akuadest, kemudian gel siap untuk di analisis.

HASIL

Dari hasil penelitian dengan metode SDS-PAGE didapatkan pita-pita protein



Gambar 1. Hasil analisis protein granuloma periapikal dengan *Sodium Dodecyl Sulphate* – *Polyacrilamid Gel Elektroforesis* (SDS-PAGE)

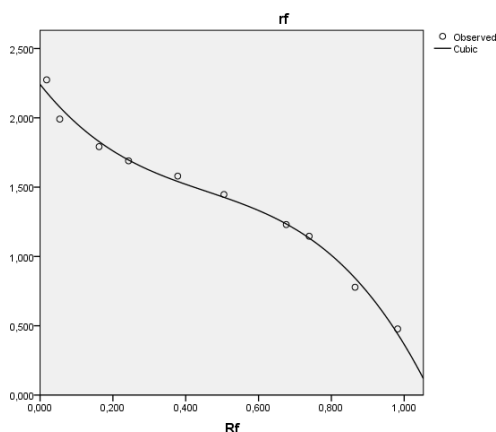
Gambar 1. menunjukkan hasil analisis protein granuloma periapikal yakni diperoleh 13 protein, dengan berat molekul relatif terdeteksi yaitu 175,388 kDa; 67,531 kDa; 58,139 kDa; 54,308 kDa; 45,304 kDa; 31,423 kDa; 27,444 kDa; 21,925 kDa; 17,513 kDa; 14,067 kDa; 12,130 kDa; 8,483 kDa dan 4,717 kDa.

Untuk mengetahui berat molekul dari pita-pita protein granuloma periapikal yang terdapat pada gel dilakukan dengan cara membandingkan antara berat molekul dengan Rf (Retardation Factor). Tahap pertama, perhitungan dilakukan pada marker dengan cara mencari nilai Rf sebagai sumbu X yaitu dengan membandingkan antara jarak awal (jarak pergerakan protein dari tempat awal yang dibatasi oleh pita). Sedangkan sumbu Y merupakan nilai log dari berat molekul marker yang telah diketahui berat molekulnya. Perhitungan persamaan regresi linier protein marker dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pehitungan Persamaan Regresi Protein Marker

BM Marker Protein (kDa)	Rf	Log
188	0,018	2,274
98	0,054	1,991
62	0,162	1,792
49	0,243	1,690
38	0,378	1,580
28	0,505	1,447
17	0,676	1,230
14	0,739	1,146
6	0,865	0,778
3	0,982	0,477

Selanjutnya, tahap kedua adalah perhitungan pada protein sampel dengan cara mencari nilai Rf (sumbu X) dan dicari apakah terdapat hubungan linear antara Rf (sumbu X) dengan log Y berdasarkan kurva linear yang tampak pada gambar 2.



Gambar 2. Persamaan garis regresi mempunyai persamaan kubik

Berdasarkan perhitungan antara berat molekul dan Retardation Factor dengan menggunakan regresi linear diperoleh persamaan sebagai berikut $y = -3,890 x^3 + 5,326 x^2 + (-3,312)$

$x + 2,242$. Perhitungan dilakukan dengan program SPSS (*Statistical Program for Social Society*).

Keterangan :

Y = log berat molekul pita yang diukur

X = Rf dan pita yang diukur

Perhitungan berat molekul protein dapat diketahui dengan mencari nilai anti log dari Y dan hasil perhitungannya dapat dilihat pada Tabel 2 berikut ini.

Tabel 2. Perhitungan berat molekul granuloma periapikal

	Panjang Pita	Rf	Log BM	BM
Pita 1	0	0	2,244	175,388
Pita 2	0,9	0,162	1,830	67,531
Pita 3	1,1	0,198	1,764	58,139
Pita 4	1,2	0,216	1,735	54,308
Pita 5	1,5	0,270	1,656	45,304
Pita 6	2,3	0,414	1,497	31,423
Pita 7	2,65	0,577	1,438	27,444
Pita 8	3,2	0,658	1,341	21,925
Pita 9	3,65	0,721	1,243	17,513
Pita 10	4	0,721	1,148	14,067
Pita 11	4,2	0,757	1,084	12,130
Pita 12	4,6	0,829	0,929	8,483
Pita 13	5,1	0,919	0,674	4,717

PEMBAHASAN

Granuloma periapikal adalah lesi inflamasi pada periapikal yang berjalan dalam waktu yang lama dengan resorpsi tulang periapikal dan membentuk granulomatus. ¹⁸Periodontitis apikalis kronis (granuloma periapikal) adalah tipe reaksi inflamasi kronis dengan karakteristik adanya sel radang kronis seperti limfosit, makrofag dan sel plasma. Aktivitas dari makrofag adalah

memproduksi sitokin. Sitokin yang berperan dalam proses inflamasi yang terdiri dari IL-1, IL-6, IL-8 dan TNF- α dan sitokin anti inflamasi terdiri dari IL-4 dan IL-10. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa protein yang terkandung pada IL-1 β dengan berat molekul 17 kDa, IL-4 dengan berat molekul 17 kDa, IL-8 dengan berat molekul 11 kDa, IL-10 dengan berat molekul 20 kDa dan TNF- α dengan berat molekul 26 kDa.¹⁰

Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi berat molekul protein yang terkandung pada granuloma periapikal dengan menggunakan metode *Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamid Gel Elektroforesis* (SDS-PAGE). Teknik ini merupakan teknik yang digunakan untuk mendeteksi protein berdasarkan berat molekul. Metode ini dapat mendeteksi protein berdasarkan berat molekulnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu. Prinsip dasar dari metode ini adalah denaturasi protein oleh *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) dengan separasi molekul berdasarkan berat molekulnya dengan metode elektroforesis menggunakan gel, dalam hal ini yang digunakan adalah *polyacrilamid*. Bila protein tersebut ditransfer ke dalam gel dan dielektroforesis dengan menggunakan listrik, protein bermigrasi menembus pori-pori gel *polyacrylamide*, protein akan berpisah berdasarkan ukuran molekul.¹⁹

Perhitungan dengan menggunakan regresi linier akan terdapat kemungkinan perbedaan relatif dalam menentukan jarak pita protein maupun panjang dan awal pengukuran gel, maka kemungkinan ada beberapa protein yang memiliki sedikit perbedaan dengan peneliti lain, tetapi sebenarnya yang dimaksud adalah pita protein yang sama.¹⁶

Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan SDS – PAGE tersebut adalah kemurnian isolat, kebersihan isolat, konsentrasi protein dalam ekstrak. Isolat yang murni akan menghasilkan pita protein yang baik, tidak terdapat pita protein yang menggelembung sehingga dapat mempermudah analisis berat molekul relatif (Mr) pada pita yang terbentuk. Keberhasilan isolat mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk dalam gel, pita terlihat tajam dengan gel yang terang sehingga mempengaruhi analisis protein. Konsentrasi protein ekstrak mempengaruhi kualitas pita protein yang terbentuk pada proses analisis karakteristik protein nuga kecepatan pembentukan pita protein.¹⁶

Identifikasi protein menggunakan *Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamid Gel Elektroforesis* (SDS-PAGE) pada granuloma periapikal menunjukkan pita - pita protein dengan berat molekul (BM) yang diperoleh dari nilai Retardation Factor (Rf) dan didapatkan persamaan regresi kubik $y = -3,890 x^3 + 5,326 x^2 + (-3,312) x + 2,242$.

Hasil penelitian yang telah dilakukan pada granuloma periapikal dengan metode SDS-PAGE diperoleh 13 protein, yaitu 8,483 kDa, kemudian yang kedua 12,130 kDa, yang ketiga 54,308 kDa, yang keempat 58,139 kDa, kelima 21,925 kDa, keenam 45,304 kDa, ketujuh 175,388 kDa, ke delapan 67,531 kDa, ke sembilan 31,423 kDa, kesepuluh 27,444 kDa, kesebelas 17,513 kDa, keduabelas 14,067 kDa, dan yang ketiga belas 4,717 kDa.

Menurut hasil penelitian tersebut, bahwa pita protein dengan berat molekul 12,130 kDa dan 8,483 kDa dimungkinkan sebagai IL-8 karena berat molekul tersebut sama seperti berat molekul yang terkandung pada IL-8. Maka dapat dimungkinkan bahwa IL-8 adalah mediator yang dominan pada proses peradangan kronis. IL-8 merupakan sitokin yang diproduksi oleh makrofag.¹²

Pada pita protein dengan berat molekul 54,308 kDa dapat diduga protein ini merupakan famili dengan p53, mengingat protein tersebut hampir mirip dengan protein 54,308 kDa. Suatu riset penelitian yang telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya bahwa pada kanker rongga mulut didapatkan inaktivasi p53. Gen p53 adalah kelompok protein TSGs (*Tumor Suppressor Gens*) yang menyandi protein dengan berat molekul 53 kDa. Gen p53 adalah gen yang mempunyai peranan penting terhadap pembelahan sel maupun apoptosis, inaktivasi p53 dapat menjadi suatu keganasan.^{13,17} Granuloma periapikal dapat berkembang menjadi suatu keganasan, maka perlu diwaspadai bila terdapat infeksi granulomatous pada rongga mulut.

Pita protein dengan berat molekul 58,139 kDa dapat diduga sebagai p58. Sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa pada tumor rongga mulut didapatkan protein dengan berat molekul 58 kDa. Protein tersebut bersifat imunogenik. Diduga protein dengan berat molekul 58,139 kDa sama dengan yang terdapat pada tumor rongga mulut. Hal ini di asumsikan bahwa protein 58,139 kDa dapat digunakan sebagai bakal calon imunoterapi

atau imunodiagnosis suatu pertumbuhan peradangan di rongga mulut.¹⁴

Pada pita protein yang menunjukkan berat molekul 21,925 kDa dapat di asumsikan merupakan mediator proinflamasi IL-10 dengan berat molekul 20 kDa. IL-10 mengaktivasi VEGF yang bertanggung jawab pembentukan pembuluh darah baru.¹⁵

Pada pita protein dengan berat molekul 17,513 kDa dapat diduga sebagai IL-1 β dan IL-4 karena pada interleukin tersebut didapatkan 17 kDa. Pada IL-1 β sangat berperan pada inflamasi kronis maupun akut. Sedangkan pada IL-4 memiliki peran sebagai pemicu proliferasi limfosit B. Hal ini sesuai dengan konsep bahwa proses inflamasi terkait pada respon imun.³

Pada pita protein yang menunjukkan berat molekul 27,444 kDa dapat setara dengan TNF- α dengan berat molekul 26 kDa. Namun, pada pita protein tersebut tidak tebal. TNF- α diproduksi oleh makrofag sebagai respon terhadap aktivasi oleh bakteri LPS (endotoksin). TNF- α merupakan mediator pro-inflamasi yang merangsang neutrophil pada proses inflamasi. Selain itu TNF- α berperan pada inflamasi akut atau awal terjadinya inflamasi.³

DAFTAR PUSTAKA

1. Worotitjan I, Christy NM, Paulina G. Pengalaman karies gigi serta pola makan dan minum pada anak sekolah dasar di desa kiaw kecamatan kawangkoan utara. *Jurnal e-GiGi (eG)* 2013; 1(1): 59-68.
2. Yustina AR, Ketut S, Dian AW. Peningkatan jumlah osteoklas pada peradangan periapikal akibat induksi lipopolisakarida porphyromonas gingivalis (suatu penelitian laboratories menggunakan tikus). *JBP* 2012; 14(3): 140 – 4.
3. Kumar, Abbas, Aster. *Robbins Basic Pathology*. Elsevier's Health: USA. 2006
4. Sutasmi & Yeyen. Identifikasi bakteri pada saluran akar dengan periodontitis apikalis akut. Skripsi. Makassar: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanudin; 2012. p. 5-14.
5. Omoregie, Ojo M, BDO Saheeb, Odukoya. Periapical granuloma associated with extracted teeth. *Nigerian Journal of Clinical Practice* 2011; 14: 293- 6
6. Regezi, Sciubba dan Jordan. *Oral Pathology (Clinical Pathologic Correlations) fifth edition*. China: Elsevier. 2008. Pp: 237-240
7. Sirait T, Sri R, Merry S, Gemala B. Kista radikuler multipel pada maksila. *Majalah Kedokteran FK UKI* 2010; 27(4): 162
8. Shear M. *Cysts of the oral and maxillofacial regions*, 4th ed. Copenhagen: Blackwell Munksgaard. 2007. Pp: 123-142
9. Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Z. Metzger Traumatol* 2000; 16: 1–8.
10. Chandra A, Ritesh KS, Mahendra PK, Raj K, Rajeshwar NS, Aditya BP. The anti-inflammatory and antibacterial basis of human omental defense: selective expression of cytokines and antimicrobial peptides 2011; 6(5): 1-11.
11. Ayuningtyas N. Efek pemberian lactoferin 10mg/ml terhadap ekspresi interleukin-8 dan interleukin 10 pada traumatic ulser. Skripsi. Surabaya. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga; 2012.
12. Foulkes, W.D p53 Master and Commander. *N Engl J Med* 2007; 357(25): 2539 - 41.
13. Budhy TI. Imunoterapi kanker rongga mulut pada suku Jawa menggunakan antigen spesifik p58. Laporan Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. 2009.
14. Istiati Soepribadi. *Regenerasi dan Penyembuhan untuk Kedokteran Gigi*. Jakarta: CV Sagung Seto. 2013.
15. Kusnoto. Isolasi dan karakteristik protein imunologik larva stadium ii toxocara cati isolat lokal. Tesis. Surabaya. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga; 2003
16. Budhy TI. Karsinogenesis karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang terinfeksi epstein-barr virus (ebv) berdasar ekspresi p53, c-myc dan bcl-2. Tesis. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya. 2004: 15-18
17. Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC. *Endodontic 6th ed.* :Shelton USA, Mc Graw-Hill. 2008;6: 494-519
18. Rantam, Fedik A.. *Metode Imunologi*: Airlangga University Press. Surabaya. 2003: 145-55