

The effect of all- trans retinoic acid supplementation to periodontitis

Pengaruh suplementasi *all-trans* asam retinoat pada periodontitis.

¹)Praptiwi Hanafi

²)Enik Sulistyowati

³)Kustiono

^{1,2,3})Dosen Jurusan Ilmu Gizi Poltekkes Kemenkes Semarang
Jl. Wolter Monginsidi 115, Pedurungan, Semarang
E-mail: praptiwi_drg@yahoo.co.id

Abstract

Vitamin A metabolite *all-trans* retinoic acid (ATRA), regulates periodontal collagen synthesis. Type 1 collagen, main component of periodontium was destroyed in periodontitis.

Objectives: to study the effect of ATRA to body weight (BW), periodontal structure, ATRA concentration, and collagen status.

Method: 26 Wistar adult male rat of 8 weeks were used in the experimental study with *Rancangan Acak Lengkap*. Randomly chosen samples were divided into induced periodontitis through *Porphyromonas gingivalis* inoculation, and not induced. Tetracycline of 18.36 mg/day were given beginning from the finding of periodontitis, for 8 days. Randomly chosen samples were given ATRA 100 and 1000 µg/day, with A₀ group as control. Body weight were measured using digital balance, periodontal tissue with light microscope, tissue ATRA concentration with High Performance Liquid Chromatography, collagen status i.e synthesis and degradation with Reverse Transcriptase Polymerizing Chain Reaction, spectrophotometry UV-VIS and Thin layer chromatography. T test was used to analyze BW mean difference among 3 groups before, also after ATRA supplementation. ANOVA was used to analyze BW and collagen status after ATRA supplementation.

Result: There were no significant difference BW before and after supplementation (p=0.063 and 0.804). *All-trans* retinoic acid improves the collagen fiber structure. Amount of ATRA and RNA were not yet measured due to lack of time, technician & instrumentation, while they were needed to gain more measurable data.

Keywords: periodontitis, ATRA supplementation, collagen status, Wistar rat.

1. Pendahuluan

Defisiensi vitamin A masih merupakan masalah kesehatan / gizi utama di Indonesia. Metabolit vitamin A khususnya *all-trans* asam retinoat (ATRA) mengatur sintesis kolagen jaringan penyangga gigi (periodontium) (Boyd et al, 2001).

Peradangan kronik jaringan periodontium atau periodontitis merupakan kelanjutan dari radang gusi. Dampak negatif respon tubuh terhadap peradangan ditimbulkan oleh meningkatnya kebutuhan energi dan erosi cepat massa bebas lemak (Demling et al, 2000). Bila proses infeksi tidak dapat dihilangkan dan menjadi kronik,

komposisi tubuh akan mengalami kerusakan yang berarti (Beisel, 1992).

Periodontitis disebabkan oleh bakteri periodontopatik (Carranza et al, 2002) terutama *Porphyromonas (P) gingivalis* (Kido et al, 2004). Penelitian di perkebunan teh di Jawa Barat mendapatkan prevalensi periodontitis yang sangat tinggi pada pekerja yaitu mencapai 94% pada orang dengan status gizi baik (Arief dkk, 1995).

Periodontitis berlanjut dengan tanggalnya gigi secara dini yang berdampak pada kejadian kurang gizi / Kurang Energi Protein (KEP). Pada tahun 2006 di kota Semarang 15,73% balita masih berada dalam status gizi kurang

dan buruk (Dinas Kesehatan Kota Semarang, 2007).

Kolagen tipe 1 adalah komponen utama pembentuk jaringan periodontium. Pada peri-odontitis, terjadi degradasi berat serat kolagen, sehingga sintesis kolagen sangat diper-lukan (Kuiper et al, 2004).

Petanda spesifik sintesis kolagen tipe 1 di tingkat molekuler adalah Ribonucleic acid Procollagen 1 Carboxy-terminal Propeptide (RNA P1CP) (Kuiper et al, 2004; Granner, 1996). Degradasi kolagen tipe 1 ditunjukkan oleh Ribonucleic acid Matrix Metalloproteinase-2 (RNA MMP-2). Peningkatan ekspresi gen MMP-2 ditekankan oleh asam retinoat (Nagase et al, 1999). Asam tersebut juga mampu mereduksi kolagenase, enzim yang mendegradasi kolagen (Lateef et al, 2004), disamping mempengaruhi sintesis fibroblas untuk memro-duksi kolagen (Personelle et al, 1997).

Tetrasiklin dosis standar jangka panjang dalam pengobatan periodontitis selain bersifat antibakteri, juga menghambat aktivitas kolagenase (Affinity Laboratory Tech-nologies, 2006; Simon, 2004; Oringer, 2002; Nagy et al, 2002). Studi eksperimental jangka panjang pada hewan coba dengan antibiotika, juga suplementasi, perlu dilakukan sebelum penerapannya pada manusia (Berkowitz et al, 2001). Tikus laboratorium sangat baik digunakan untuk penelitian pengobatan periodontal dengan mengikuti fase-fase regene-rasi jaringan dalam rangka kesembuhan (Darmana, 2005; Mangkoewidjojo, 2003). Sifat tikus yang kurang menguntungkan sebagai hewan coba adalah kecenderungannya un-tuk sembuh dari infeksi (Mangkoewidjojo, 2006).

Nilai normal RNA P1CP dan RNA MMP-2 belum diketahui, sehingga nilai sampel sehat akan menjadi nilai normalnya.

Tujuan penelitian adalah mempelajari pengaruh 2 jenis dosis suplementasi ATRA yaitu λ_1 dan λ_2 , berturut-turut 100 dan 1000 μg / hari

pada tikus periodontitis yang diobati dengan tetrasiklin, mengingat defisiensi vitamin A yang masih menjadi masalah besar di Indonesia, juga tingginya periodontitis sebagai salah satu penyebab KEP.

2. Metode

Jenis penelitian adalah studi preklinik, eksperimental dengan rancangan Acak Lengkap (Campbell et al, 1963). Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Unit 3 dan 4 UGM Yogyakarta, mulai Desember 2007.

Populasi target adalah tikus Wistar jantan dewasa umur 8 minggu. Hewan coba dibuat periodontitis melalui induksi dengan bakteri *Porphyromonas (P) gingivalis* 3 kali selama 4 hari. Selanjutnya diberikan pengobatan tetrasiklin dosis 18,36 mg/hari.

Populasi terjangkau adalah tikus Wistar jantan dewasa umur 8 minggu. Hewan coba dibuat periodontitis dan mendapat pengobatan tetrasiklin dosis 18,36 mg/hari di LPPT Unit 3 dan 4 UGM Yogyakarta. Sampel (perlakuan dan kontrol) dipilih secara acak se-derhana dari populasi terjangkau. Kriteria inklusi sampel : tikus Wistar jantan dewasa umur 8 minggu, dibuat periodontitis dan mendapat pengobatan tetrasiklin dosis 18,36 mg/hari. Kriteria eksklusi adalah bila kehilangan nafsu makan, dan atau diare.

Besar sampel bagi kelompok perlakuan (mendapat suplementasi ATRA) dan tanpa perlakuan ditentukan berdasarkan ketetapan WHO (1993). Kelompok perlakuan dan tanpa perlakuan masing-masing 5 ekor ditambah 1 ekor sebagai antisipasi *drop out* (Tambunan dkk, 2002), sehingga masing-masing kelompok terdiri atas 6 ekor tikus.

Hewan coba sehat / tanpa perlakuan sebanyak 2 ekor dikorbankan pada awal pe-nelitian untuk mengetahui nilai normal kadar ATRA jaringan.RNA P1CP dan RNA MMP-2. Pada akhir

penelitian 2 hewan coba sehat dikorbankan untuk mengetahui nilai normal kadar ATRA jaringan dan RNA oleh pengaruh maturasi dengan bertambahnya umur.

Untuk mendeteksi periodontitis, 4 hewan coba sehat diinokulasi dengan bakteri *P. gingivalis*. Besar sampel dengan demikian = $(3 \times 6) + 2 + 2 + 4 = 26$ ekor. Setelah 3 minggu se-jak inokulasi terakhir, terlihat tanda-tanda periodontitis pada sediaan mikroskopik ja-ringan periodontium. Tujuh hari setelah deteksi, terjadi periodontitis kronik. Pengelompokan sampel untuk 2 jenis perlakuan sesuai dosis ATRA yang disuplemen-tasikan dan yang tanpa perlakuan, dilakukan secara acak sederhana.

Variabel penelitian adalah suplementasi ATRA dosis 1 dan 2, berturut-turut 100 dan 1000 μg / hari sebagai variabel bebas, kadar ATRA jaringan periodontium, dan RNA P1CP serta RNA MMP-2 sebagai variabel tergantung. Kadar ATRA jaringan peri-odontium adalah kadar ATRA yang diukur menggunakan *High Performance Liquid Chro-matography* (HPLC), dalam satuan mg/ml, skala rasio, dengan rentang nilai normal dari subyek sehat tanpa suplementasi. Suplementasi X_1 adalah banyaknya serbuk ATRA yaitu 100 μg /hari (Belloni *et al*, 2000), dilarutkan dalam minyak jagung, diukur dengan timbangan analitik digital, skala rasio, diberikan 1 kali / hari di pagi hari, selama 7 hari.

Suplementasi X_2 adalah banyaknya serbuk ATRA yaitu 1000 μg /hari (Mangkoewidjojo, 2003), dilarutkan dalam minyak jagung (Miano *et al*, 1998), diukur dengan timbangan analitik digital, skala rasio, diberikan 1 kali / hari di pagi hari, selama 7 hari. *Ribonucleic acid* (RNA) P1CP adalah ekspresi RNA P1CP sebagai petanda sintesis kolagen tipe 1 dalam jaringan perio-dontium yang diukur dengan mesin *Reverse Transcriptase Polymerizing Chain Reaction* (RT PCR), spektrofotometri UV-VIS, dan

Kromatografi lapis tipis, satuan μg /ml, skala rasio, dengan rentang nilai normal diperoleh dari subyek sehat tanpa suplementasi, pada u-mur yang sama. *Ribonucleic acid* (RNA) MMP-2 adalah ekspresi MMP-2 sebagai petanda degradasi kolagen tipe 1 dalam jaringan periodontium yang diukur dengan mesin *Re-verse Transcriptase Polymerizing Chain Reaction* (RT PCR), spektrofotometri UV-VIS, dan Kromatografi lapis tipis, satuan μg /ml, skala rasio, dengan rentang nilai normal diperoleh dari subyek sehat tanpa suplementasi, pada umur yang sama.

Bahan terdiri dari anaerobic gas pack, media darah, pengecatan: Hematoksilin eosin dan Mallory, alkohol, eter, *Phosphate buffer saline* (PBS),perangkat reagen untuk pengukuran kadar ATRA, isolasi RNA P1CP, RNA MMP-2, dan sintesis cDNA; primer P1CP, MMP-2 dan GAPDH, serta senyawa-senyawa kimia pendukung lain.

Instrumen dalam penelitian adalah cawan Petri, tabung reaksi, ose, inkubator, mikroskop cahaya, HPLC, elektroforesis gel, mesin RT PCR, spektrofotometer, kroma-togram lapis tipis, *deepfreeze refrigerator*, centrifuge, tabung bertutup dg sekrup, bejana, pemanas, *dispenser*, micro tips, *digital scale spuit*, spuit berkanula, pinset, gunting, cotton bud, timbangan digital, sentrifug, serta berbagai alat pendukung lain.

Cara / prosedur penelitian. Diawali dengan pengajuan Ethical Clearance ke Ko-misi Kode Etik FK UNDIP dan RS Dr Kariadi Semarang. Setelah ijin diterima, 26 hewan coba diadaptasikan dalam kandang individual selama 4 hari, kemudian diambil 2 ekor untuk diambil jaringan periodontal regio molaresnya, dan diukur kadar ATRA, RNA P1CP, dan RNA MMP-2, sebagai nilai standar normal.

Perubahan berat badan (BB), hewan coba ditimbang pada awal dan akhir studi. Hewan coba dibuat periodontitis dengan cara diinokulasi bakteri *P. gingivalis* $\pm 0,2$ ml dari $1,5 \times 10^9$ sel / ml

dalam PBS setara dengan NaCl 0,1N 3 kali selama 4 hari langsung ke lambung, diaplikasikan pada semua tepi gingiva regio molares atas, bawah, kiri, ka-nan, juga swabbing pada daerah kolorektal.

Setelah 1 minggu, 1 ekor diambil jaringan periodontal regio molares untuk de-tekstasi periodontitis di laboratorium Patologi Anatomi FK UGM di Yogyakarta. Pada minggu ke 3 setelah inokulasi, jaringan periodontium dibawah mikroskop memperlihatkan banyak monosit dan vasodilatasi dengan banyak eritrosit yang menandakan periodontitis.

Persiapan untuk pemberian perlakuan adalah membagi hewan coba menjadi 3 kelompok secara acak sederhana. Kelompok A₁ yang mendapat suplementasi X₁, yaitu sampel periodontitis dengan pengobatan tetrasiklin dan suplementasi ATRA dosis 100 µg /hari; Kelompok A₂ yang mendapat suplementasi X₂, yaitu sampel periodontitis dengan pengobatan tetrasiklin, dan suplementasi ATRA dosis 1000 µg /hari; dan kelompok A₀ atau kontrol, tanpa suplementasi. Suplementasi ATRA diberikan setelah periodontitis menjadi kronik, yaitu 7 hari sejak terdeteksi periodontitis, selama 7 hari.

Pada hari ke 8, sampel ditimbang BBnya untuk mengetahui BB akhir studi. Selanjutnya semua dikorbankan untuk diambil jaringan periodontiumnya di regio molares atas, ba-wah, kiri, dan kanan. Dilakukan ekstraksi jaringan, selanjutnya diukur kadar ATRA de-ngan HPLC. Isolasi RNA dilakukan dengan RT PCR menggunakan primer PICP, MMP-2, dan GAPDH sebagai kontrol *inert*.

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan komputer. Uji t untuk meng-uji ada atau tidak ada beda bermakna pada BB sampel awal, dan kadar ATRA jaringan pada awal dan akhir kelompok kontrol. Uji ANOVA untuk melihat pengaruh su-plementasi ATRA pada ketiga kelompok perlakuan.

3. Hasil dan pembahasan

Penelitian dilakukan setelah mendapat ijin dari Komisi Ethical Clearance. Duapuluh enam ekor hewan coba ditempatkan dalam kandang individu selama 4 hari agar beradaptasi di lingkungan baru. Selanjutnya 22 hewan coba dibuat periodontitis dengan inokulasi bakteri *P. gingivalis* sebanyak 3 kali selama 4 hari. Setelah 3 minggu sejak inokulasi terakhir, jaringan periodontal regio molares diperiksa di Bagian Patologi Anatomi. Terdeteksi periodontitis dengan banyaknya monosit, dan vasodilatasi dengan banyak eritrosit pada pemeriksaan dengan mikroskop. Satu ekor hewan coba mati, se-hingga pada akhir studi terdapat 18 hewan coba yang ditimbang BBnya, selanjutnya di-korbankan untuk diukur kadar ATRA, RNA PICP dan RNA MMP-2 jaringan periodon-tium nya.

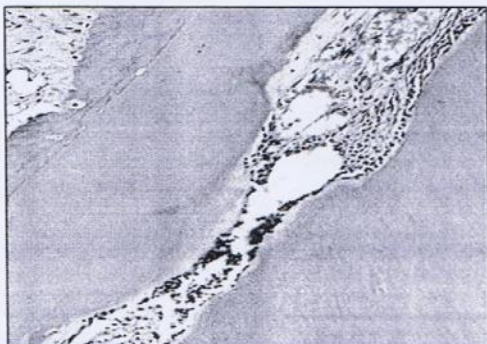
a. Pengukuran BB hewan coba.

Uji t untuk menganalisis beda rerata BB ketiga kelompok studi sebelum perlakuan tidak mendapatkan beda bermakna BB ketiga kelompok ($p=0,063$). Ketiga kelompok studi mempunyai BB yang tidak berbeda secara statistik. Uji ANOVA untuk menganali-sis beda rerata BB ketiga kelompok studi sesudah perlakuan suplementasi ATRA juga tidak mendapatkan beda bermakna BB ketiga kelompok ($p=0,804$). Disimpulkan bahwa hewan coba dengan berbagai perlakuan suplementasi ATRA mempunyai BB yang tidak berbeda, berarti tidak ditemukan efek perlakuan terhadap BB. Hasil penelitian tidak se-suai dengan pernyataan Demling *et al* (2000) dan Beisel (1992) mengenai kehilangan BB selama infeksi. Kemungkinan penyebab hal tersebut adalah kemampuan tikus untuk sembuh dari infeksi (Mangkoewidjojo, 2006).

b. Gambaran mikroskopik jaringan periodontitis

Pengecatan Hematoksilin eosin dengan pem-besaran 100x memperlihatkan banyaknya mo-nosit dalam jaringan periodontium dan pele-

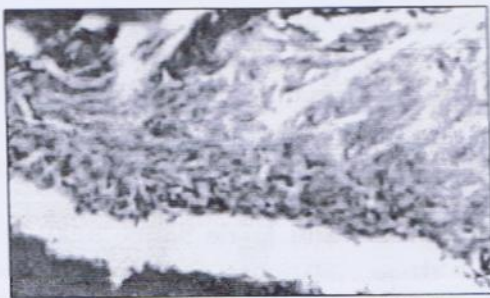
baran pembuluh darah dengan banyak eritrosit di dalamnya sebagai petanda adanya peradangan (Gambar 1).



Pengecatan Mallory dengan pembesaran 100x untuk menonjolkan kondisi serat kolagen pada jaringan periodontium sehat tidak menunjukkan banyaknya eritrosit seperti pada peradangan, juga terlihat serat-serat kolagen yang utuh (Gambar 2).

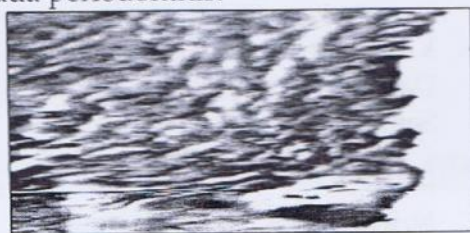


Pada keadaan periodontitis, pengecatan Mallory dengan pembesaran 100x menampakkan serat kolagen yang rusak (Gambar 3),

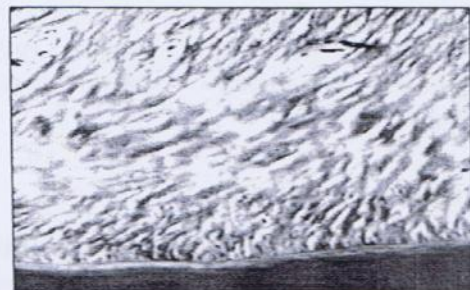


sesuai dengan pernyataan Kuiper *et al* (2004)

tentang degradasi berat serat kolagen pada periodontitis.



Gambar 4, pengecatan Mallory dengan pembesaran 100x memperlihatkan serat kolagen pada periodontitis yang mendapat tetrasiklin dosis 18,36 mg / hari. Serat kolagen nampak lebih teratur dibanding pada keadaan periodontitis dalam Gambar 3. Hasil studi didukung oleh Affinity Laboratory Technologies(2006), Simon (2004), Nagy *et al* (2002), dan Ori-nger (2002) yang menyatakan bahwa Tetrasiklin selain sebagai antibakteri, juga meng-hambat



degradasi kolagen oleh kolagenase.

Gambar 5, pengecatan Mallory dengan pembesaran 100x menjelaskan pengaruh suplementasi ATRA terhadap serat kolagen pada periodontitis yang mendapat tetrasiklin. Kolagen nampak lebih jelas dan teratur dibanding setelah memperoleh pengobatan dengan tetrasiklin saja. Asam retinoat mempengaruhi sintesis fibroblas untuk memproduksi kolagen (Personelle *et al*, 1997). Nagase *et al* (1999) menjelaskan bahwa ekspresi gen MMP-2 yang mengindikasikan degradasi kolagen ditekan oleh asam retinoat. Asam retinoat mampu mereduksi kolagenase yang mendegradasi kolagen (Lateef *et al*, 2004). Hasil penelitian didukung oleh ketiga rujukan tersebut.

c. Kadar ATRA dalam jaringan

Belum diperoleh hasil dari laboratorium mengenai kadar ATRA dalam jaringan periodontium, oleh terbatasnya alat pengukur dan teknisi yang mampu mengerjakan.

d. Ribonucleic acid PICP dan RNA MMP-2

Ribonucleic acid PICP sebagai petanda sintesis kolagen dan RNA MMP-2 petanda degradasi kolagen belum selesai ditukur,

karena terbatasnya alat-alat dan bahan yang digunakan, juga teknisnya.

Keterbatasan penelitian : terbatasnya waktu penelitian, jaranganya penelitian yang menggunakan ATRA yang berdampak pada kesiapan bahan, alat dan teknis, membatasi hasil studi khususnya pengukuran kadar ATRA dalam jaringan. Penelitian RNA yang masih termasuk baru di Indonesia, berkaitan dengan penyediaan reagen serta alat yang terbatas, juga teknis yang mampu melaksanakan, disamping waktu, juga merupakan kendala penyelesaian penelitian.

4. Simpulan dan Saran

Berat badan tikus pada periodontitis dengan besar sampel seperti dalam penelitian, bukan indikator yang baik untuk menunjukkan keadaan peradangan dan infeksi. Gambaran histopatologik memperlihatkan keadaan serat kolagen pada keadaan periodontitis, dan perbaikan yang terjadi oleh pengaruh tetrasiklin serta suplementasi ATRA.

Disarankan untuk memfasilitasi penelitian agar lengkap sesuai dengan tujuan, untuk mendapatkan data yang lebih terukur.

5. Ucapan Terimakasih

Ucapan banyak terimakasih disampaikan atas kesempatan yang diberikan untuk mendapatkan Dana Risbinakes DIPA Politeknik Kesehatan Kemenkes Semarang, sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.

6. Daftar Pustaka

Affinity Laboratory Technologies. Advances in the Treatment of Periodontal Disease [cited 2006 Jan 01]. Available from: URL:<http://www.collagenex.com>
Arief, E.M., S.E. Lambri, U.van der Velden, and G.A.van der Weijden. 1995. Prevalensi periodontitis pada

suatu populasi penduduk Indonesia yang berumur 22-32 tahun di sebuah perkebunan teh Jawa Barat. Jurnal PDGI; 44(3): 58-62.

- Beisel, W.R. 1992. Nutrisi dan Infeksi. Dalam: Biokimia Nutrisi dan Metabolisme (Lin-der, M.C.,ed), Terjemahan, p. 668.: Penerbit Universitas Indonesia; Jakarta.
- Belloni, P.N., L.Garvin, C.P.Mao, I.Bailey-Healey, and D.Leaffer. 2000. Effects of *All-trans* Retinoic Acid in Promoting Alveolar Repair. Chest; 117:235S-241S.
- Berkowitz, B.A., and B.G. Katzung. 2001. Basic and Clinical Evaluation of New Drugs In: Basic and Clinical Pharmacology. 8th Ed. Lange Medical books / McGraw-Hill. Tokyo.
- Boyd, L.D., and K.J.Lampi. 2001. Importance of nutrition for optimum health of the periodontium. The Journal of Contemporary Dental Practice ;2(2):2-3.
- Campbell, D.T., and J.C. Stanley.1963. Experimental - and Quasi Experimental- Design for Research. Rand McNally College Publishing Company. Chicago: 13-21.
- Carranza, F.A., and G.W. Bernard. 2002. The Tooth Supporting Structures. In: Newman M.G., H.H. Takei, and F.A.Carranza, editors. Clinical Periodontology. 9th. WB Saunders Company. Sydney:36-57.
- Demling,R.H., and L. de Santi. 2000. The stress response to injury and infection: role of nutritional support. Wounds; 12(1): 3-14.
- Dharmana,E. 2005. Model Binatang pada Penelitian Biomedik. Laboratorium Parasitologi. FK Undip. Semarang.
- Dinas Kesehatan Kota Semarang. 2007. Data Status Gizi Balita tahun 2006. Semarang.
- Granner, D.K. 1996. RNA Synthesis, Processing and Metabolism. In: Murray, R.K., D.K.Granner, P.A.

- Mayes, and V.W. Rodwell, editors. Harper's Biochemistry. 24thEd. Prentice-Hall International, Inc. New Jersey: 427.
- Kido, J., R.Kido, Suryono, M. Kataoka, M.K. Fagerhol, and T. Nagata. 2004. Induction of calprotectin released by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides in human neutrophils. *Oral Microbiology and Immunology*; 19: 182-187.
- Kuiper, J.I., J.H.A.M. Verbeek, V. Everts, J.P.Straub, and M.H.W. Frings-Dresen. 2005. Serum markers of collagen metabolism: construction workers compared to sedentary workers. *Occup Environ Med*; 62: 363-367.
- Lateef, H., M.J. Stevens, and J. Varani. 2004. All-trans retinoic acid Suppresses Matrix Metalloproteinase Activity and Increases Collagen Synthesis in Diabetic Human Skin in Organ Culture. *American Journal of Pathology*; 165: 167-174.
- Mangkoewidjojo, S. 2003. Hewan, Eksperimentasi Hewan, Profesi Dokter Hewan Peranan dan Masalahnya di Bidang Biomedik. University Center Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta: 4.
2006. Hewan Laboratorium dalam Penelitian Biomedik. University Center Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta: 18.
- Miano, J.M., L.A. Kelly, C.A. Artacho, T.A. Nuckolls, R. Piantedosi, and W.S. Blaneer. 1998. All-trans retinoic acid Reduces Neointimal Formation and Promotes Favorable Geometry Remodeling of the Rat Carotid Artery after Balloon Withdrawal Injury. *Circulation*; 98: 1219-1227.
- Nagase, H., and J.F.Jr. Wowssner. 1999. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem*; 274(31): 21471-21474.
- Nagy, R.J., and M.G. Newman. 2002. Treatment of Refractory Periodontitis, Aggressive Periodontitis, Necrotizing Ulcerative Periodontitis, and Periodontitis Associated with Systemic Diseases. In: Newman M.G., H.H. Takei, and F.A.Carranza, edit-ors. *Clinical Periodontology*. 9th. WB Saunders Company. Sydney:558-566.
- Oringer, R.J. 2002. Modulation of the Host Response in Periodontal Therapy. *J Periodontol*: 469-71.
- Perssonelle, J.G., S.de Campos, G.Q. Ribeiro, and R.O. Ruiz. 1997. All Trans Retinoic Acid Injectable in the Treatment of Thin Wrinkles. *Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plastica*; 12 (3): 1-11.
- Simon, H. 2002. The Autoimmune and Inflammatory Response, In: *Periodontal Disease*. (Simon H., S.A. Cannistra, J.E. Godine, E. Huang, D. Heeller, P.C. Shellito, *et al*, eds).Harvard Medical School. Harvard: 2-22.
- Tambunan, T., T.S. Soetomenggolo, J. Passat, dan I.S. Agusman. 2002. Studi Kohort dalam: Sastroasmoro, S., dan S. Ismael, editor. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis* . Ed 2. Sagung Seto. Jakarta: 129-143.
- World Health Organization (WHO). 1993. *Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines*. Manila:6.