

Kesan Perencatan Madu Gelam terhadap Kehilangan Tulang pada Tikus Periodontitis (Inhibitory Effect of *Gelam* Honey on Bone Loss in Periodontitis Rat)

AFIFAH-RADIAH FAUZI*, SALIANA A. AZIZ, NORASHIKIN HAMZAH, BADIAH BAHARIN, NORZANA ABDUL GHAFAR & MARIATI ABDUL RAHMAN

ABSTRAK

Periodontitis adalah penyakit kronik yang melibatkan kehilangan tulang dan inflamasi pada tisu periodontium. Interleukin-6 (IL-6) dan Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) merupakan penanda pro-inflamasi yang penting yang terlibat dalam periodontitis. Sebanyak 20 ekor tikus Sprague-Dawley dibahagikan kepada empat kumpulan iaitu: Kumpulan kawalan dengan salin normal (CS); kumpulan kawalan dengan madu Gelam 3 g/mL (CH); kumpulan ujian periodontitis dengan salin normal (TS); dan kumpulan ujian periodontitis dengan madu Gelam 3 g/mL (TH). Benang bersaiz 4/0 diikat pada molar pertama gigi tikus sebelah kiri bagi tujuan rangsangan penyakit periodontitis. Madu Gelam diberi secara paksa oral selama 15 hari. Selepas 15 hari, sampel plasma dan tisu dianalisis menggunakan kaedah Elisa dan pewarnaan histologi. Kehilangan tulang alveolar pada kumpulan TS adalah paling tinggi berbanding dengan kumpulan kawalan, CS dan CH namun, tiada perbezaan yang signifikan berbanding dengan kumpulan TH. Berdasarkan ujian imunohistokimia, ekspresi IL-6 dan TNF- α pada tisu periodontium adalah tinggi secara signifikan pada kumpulan TS berbanding dengan kumpulan lain. Namun, tiada perubahan aras IL-6 dan TNF- α yang signifikan pada plasma ke semua tikus kajian.

Kata kunci: Kehilangan tulang; madu; perantara inflamasi; periodontitis

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic disease which results in alveolar bone loss and inflammation at the periodontal gingival tissue. Interleukin-6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) are the crucial pro-inflammatory markers in periodontitis. Twenty Sprague-Dawley rats were divided into four groups: which was control group (CS); control treated with Gelam honey (3 g/mL) (CH); periodontitis group (TS); and periodontitis treated with Gelam honey (3 g/mL) (TH). The periodontitis was induced by ligating 4/0 suture on the left first molar tooth. After 15 days, the plasma and tissue samples were analysed using Elisa and histological staining. Alveolar bone loss was the highest in the TS group compared to control groups, CS and CH, but there was no significant difference compared to TH group. Immunohistochemistry staining showed positive expression of IL-6 and TNF- α in periodontium was significantly higher percentage in TS group compared to TH group which was 49.27% (IL-6) and 31.73% (TNF- α), respectively. However, there was no significant difference in plasma level of IL-6 and TNF- α .

Keywords: Bone loss; honey; inflammatory mediators; periodontitis

PENGENALAN

Periodontitis merupakan penyakit inflamasi yang disebabkan oleh jangkitan daripada pengumpulan plak bakteria yang mengakibatkan inflamasi pada tisu gingiva, kemusnahan tisu periodontium dan kehilangan tulang alveolar yang diakhiri dengan kehilangan gigi dalam kes yang parah (Assuma et al. 1998). Periodontitis adalah penyakit yang biasa berlaku dalam populasi manusia dan menyebabkan morbiditi yang signifikan dengan kehilangan gigi awal (Williams et al. 2002). Patogenesis periodontitis melibatkan kehadiran plak bakteria yang memulakan reaksi inflamasi setempat dalam badan yang menyebabkan edema, penyusupan leukosit yang berfungsi bagi menghadkan aras peregangan bakteria (Graves 2008) dan pembebasan pengantara inflamasi (Toker et al. 2008).

Perubahan inflamasi ini akan menyebabkan pembentukan poket periodontium, penanggalan tisu penghubung serta kehilangan tulang alveolar, yang akhir sekali akan menyebabkan kehilangan gigi (Toker et al. 2008).

Terdapat banyak faktor yang boleh menyebabkan pengumpulan leukosit, termasuklah hasil daripada bakteria seperti endotoksin, penghasilan sitokin, tindak balas antara imunitas semula jadi dan imunitas penyesuaian, kemokin, pengantara lipid serta pelengkapanya (Graves 2008). Semasa tindak balas inflamasi berlaku, beberapa penanda proinflamasi dibebaskan termasuklah IL-6 dan TNF- α (Mueller et al. 2010). Kajian yang dilakukan pada haiwan membuktikan bahawa sitokin memainkan peranan yang sangat penting dalam patogenesis periodontitis. Kajian tersebut menunjukkan perencatan Interleukin-1

(IL-1) dan *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α) akan mengurangkan perkembangan kehilangan tulang dan pelekatan yang disebabkan oleh pengumpulan sel inflamasi pada tulang (Graves et al. 1998). Selain itu, kajian oral gavaj menunjukkan mencit yang kekurangan reseptor perangsang Interleukin-6 (IL-6) (Baker et al. 1999) dan TNF- α (Garlet et al. 2007) menunjukkan pengurangan kehilangan tulang. TNF- α merupakan salah satu sitokin inflamasi awal yang dirangsang oleh patogen periodontium. Peningkatan aras TNF- α menjadi faktor risiko kepada kemusnahan tisu periodontium dan menyumbang kepada kehilangan tulang alveolar dengan meningkatkan penghasilan sel osteoklas dan penggalak awal tindak balas badan terhadap patogen periodontium yang mengawal atur matriks metaloproteinases (MMPs) yang merosakkan tisu penghubung (Khosravi et al. 2013). Dalam kajian ini, madu Gelam digunakan sebagai agen terapi. Madu Gelam (*Melalueca cajuputi*) merupakan madu yang diperolehi daripada pokok Gelam yang dihasilkan oleh lebah *Apis mellifera*. Madu Gelam mempunyai kandungan bahan fenolik yang tinggi. Kebanyakan bahan fenolik yang terdapat pada madu Gelam mempunyai kadar aktiviti anti-oksida yang tinggi (Kassim et al. 2010). Ini membolehkan ia digunakan sebagai agen kemoterapi bagi penyakit yang melibatkan radikal bebas seperti kanser dan inflamasi.

Secara umum, madu Gelam dapat berfungsi sebagai anti-inflamasi, ini meningkatkan kemungkinan menjadi agen terapi bagi penyakit periodontitis. Tiada penyelidikan saintifik yang menunjukkan kesan madu Gelam terhadap kehilangan tulang pada kawasan furkasi tisu periodontium periodontitis sebelum ini, oleh yang demikian, penyelidikan ini dijalankan bertujuan bagi mengkaji kesan madu Gelam terhadap aktiviti penanda inflamasi, IL-6 dan TNF- α serta kehilangan tulang pada kawasan furkasitikus Sprague-Dawley yang diaruh periodontitis.

KAEDAH KAJIAN

Prosedur yang melibatkan haiwan kajian dijalankan mengikut protokol yang telah diluluskan oleh pihak etika haiwan Universiti Kebangsaan Malaysia (FD/PERIOD/2011/BADIAH/23-NOVEMBER/395-NOVEMBER-2011-JULY-2012). Tikus strain Sprague-Dawley diperolehi dari Unit Haiwan Fakulti Sains dan Teknologi, UKM. Sebanyak 20 ekor tikus Sprague-Dawley jantan yang mempunyai julat berat antara 280 hingga 350 g digunakan. Kesemua tikus tersebut diaklimatasi selama seminggu di makmal Jabatan Biokimia, Fakulti Perubatan, UKM bagi tujuan penyesuaian kepada persekitaran baru. Tikus tersebut diletakkan dalam keadaan cerah selama 12 jam dan dalam keadaan gelap selama 12 jam. Suhu bilik ditetapkan kepada 21°C sepanjang kajian. Kesemua tikus diberi makanan 'rat chow' dan air suling yang dibekalkan secara *ad-libitum*. Berat tikus diambil secara berkala setiap 3 hari selama 15 hari kajian dan dicatat.

REKA BENTUK KAJIAN

Kesemua tikus kajian dibahagikan secara rawak kepada empat kumpulan utama iaitu: kumpulan kawalan yang diberi salin normal (CS); kumpulan kawalan yang diberi makan madu Gelam 3 g/mL (CH); kumpulan ujian periodontitis yang diberi salin normal (TS); dan kumpulan ujian periodontitis yang diberi makan madu Gelam 3 g/mL (TH). Salin normal dan madu Gelam diberi kepada tikus kajian secara makan paksa oral.

Bagi kumpulan ketiga dan keempat, sebelum rawatan dimulakan tikus diaruh dengan periodontitis dengan mengikat sutur atau benang pada gigi molar pertama sebelah kiri tikus tersebut. Selepas tempoh 15 hari, darah tikus diambil dan disimpan bagi ujian Elisa. Tikus dikorbangkan dengan dislokasi servikal untuk dibedah dan mendapatkan mandibel. Seterusnya organ tersebut disimpan dalam formalin sebelum diproses dengan pewarnaan imunohistokimia dan H & E.

UJIAN ELISA

Plat mikrotiter diselaputi dengan antibodi IL-6 dan TNF- α . Seterusnya, piawai atau sampel ditambah dengan antibodi yang dikonjugasi dengan biotin. Kemudian, avidin (IL-6) dan streptavidin (TNF- α) konjugasi kepada peroksidase lobak putih (HRP) ditambah dan seterusnya diinkubasi. Substrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) (Cusabio, Cina) ditambah kepada setiap telaga. Telaga yang mempunyai IL-6 dan TNF- α , antibodi-biotin dan enzim konjugasi avidin atau streptavidin yang akan bertukar warna daripada tidak berwarna kepada biru. Tindak balas tersebut dihentikan dengan penambahan asid sulfurik. Bacaan diukur pada panjang gelombang 450 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

UJIAN IMUNOHISTOKIMIA

Selepas proses nyah lilin dan rehidrasi, slaid parafin melalui proses inkubasi di dalam larutan sasaran dapatan semula larutan (TRS) (Dako, USA) pada suhu 90°C selama 20 min untuk mengesan sel positif TNF- α pada tisu mandibel atau direndam dalam larutan TRS pada suhu 37°C selama 20 min untuk mengesan sel positif IL-6 pada tisu mandibel. Slaid kemudian disejukkan dalam TRS pada suhu bilik selama 20 min. Slaid direndam dalam larutan hidrogen peroksida (H₂O₂) (Dako, USA) bagi tujuan menghentikan aktiviti endogenous peroksida.

Slaid direndam dalam salah satu antibodi primer: poliklonal tikus anti-IL-6 (Abcam, UK) selama 2 jam atau poliklonal tikus anti-TNF- α (Abcam, UK) selama 30 min dan diletakkan di atas bekas basah dan disimpan pada suhu 2°C hingga 8°C. Pencairan antibodi sekunder adalah 1:1000 untuk anti-TNF- α dan anti-IL-6.

Selepas itu, slaid direndam ke dalam larutan PBS selama 3 min sebanyak tiga bilasan, slaid diinkubasi selama 15 min pada suhu bilik dengan menggunakan antibodi sekunder (System/HRP, Rb (Dako)). Selepas dibilas dengan penimbal fosfat PBS dan ditandakan

dengan larutan 3,3-diaminobenzidin selama 5 min, slaid diwarnakan dengan hematoksin selama 30 s dan dibilas dengan air mengalir. Slaid didehidrasi dengan larutan alkohol dalam kepekatan menaik, dibasuh dengan xilin dan dilekapkan dengan slip penutup. Kawalan bagi prosedur imunohistokimia ini diperoleh dengan tidak meletakkan antibodi primer pada slaid tisu.

PEWARNAAN HEMATOKSILIN & EOSIN

Selepas proses rehidrasi dilakukan, slaid direndam dalam larutan hematoksin selama lima min bagi tujuan pewarnaan nukleus. Selepas itu, slaid dibilas di bawah air mengalir sehingga warna dalam bekas pewarnaan menjadi tidak berwarna. Slaid kemudian direndam pula di dalam asid alkohol selama 3 s dan dibilas dengan aliran air paip selama 3 min. Selepas itu, slaid direndam dalam larutan eosin selama seminit.

Bagi proses dehidrasi, kepekatan alkohol bersiri digunakan. Slaid direndam dalam larutan alkohol masing-masing 50, 70, 80 dan 95%, selama tiga min. Slaid kemudian direndam dalam larutan alkohol pekat (100%) sebanyak dua kali, selama tiga min bagi setiap rendaman. Slaid direndam pula dalam dua salinan xilin selama lima min setiap rendaman. Akhir sekali, slaid ditutup dengan penutup kaca menggunakan gam distrin, plastisider dan xilin DPX. Kehilangan tulang pada kawasan furkasi diukur dengan mengambil bacaan ruang tisu periodontium pada kawasan furkasi molar pertama, dengan jarak vertikal 1 mm dari puncak furkasi (Luo et al. 2014). Luas kawasan furkasi diukur dengan menggunakan perisian komputer β cell pada gambar mikroskopik. Bacaan diulang dan purata luas kawasan diambil. Kawasan furkasi yang diukur adalah seperti foto mikrograf 1.

ANALISIS STATISTIK

Analisis data dijalankan dengan menggunakan perisian *Statistical package for social science* (SPSS), versi 22. Taburan data yang diperoleh diuji kenormalannya dengan

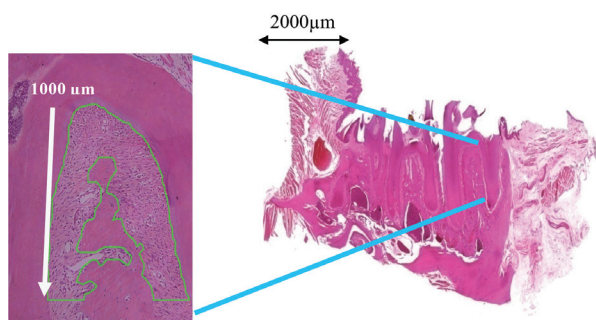


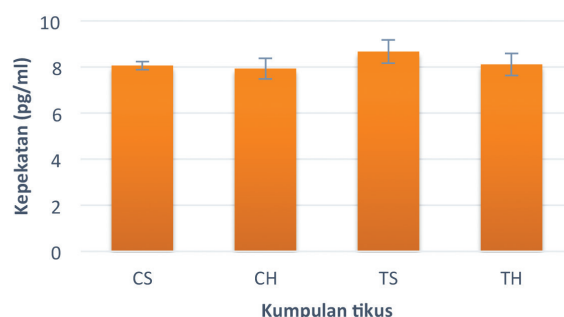
FOTO MIKROGRAFI 1. Pewarnaan H & E bagi keratan longitudinal tisu mandibel. Anak panah biru menunjukkan kawasan furkasi yang terlibat dalam pengukuran kehilangan tulang. Gambar pembesaran merupakan kawasan yang diukur iaitu luas ruang tisu periodontium

menggunakan ujian Shapiro-Wilk. Jika data yang diperoleh tertabur secara normal, maka ujian analisis varians (ANOVA) satu hala digunakan diikuti dengan ujian Turkey Post-hoc.

KEPUTUSAN KAJIAN

ARAS IL-6 DALAM PLASMA

Tiada perbezaan yang signifikan didapati pada aras IL-6 dalam plasma pada kesemua kumpulan tikus kajian (Rajah 1).

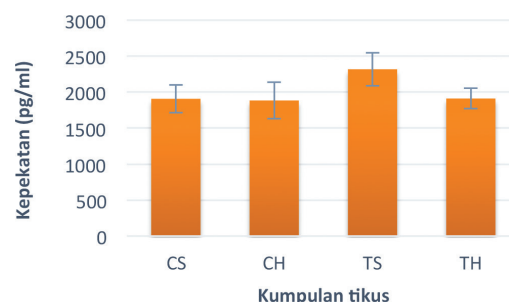


Nilai dinyatakan dalam bentuk purata \pm purata ralat piawai, $p > 0.05$

RAJAH 1. Graf menunjukkan aras IL-6 dalam plasma pada semua kumpulan tikus

ARAS TNF- α DALAM PLASMA

Tiada perbezaan yang signifikan didapati pada aras TNF- α dalam plasma pada kesemua kumpulan tikus kajian (Rajah 2).



Nilai dinyatakan dalam bentuk purata \pm purata ralat piawai, $p > 0.05$

RAJAH 2. Graf menunjukkan aras TNF- α dalam plasma kesemua kumpulan tikus

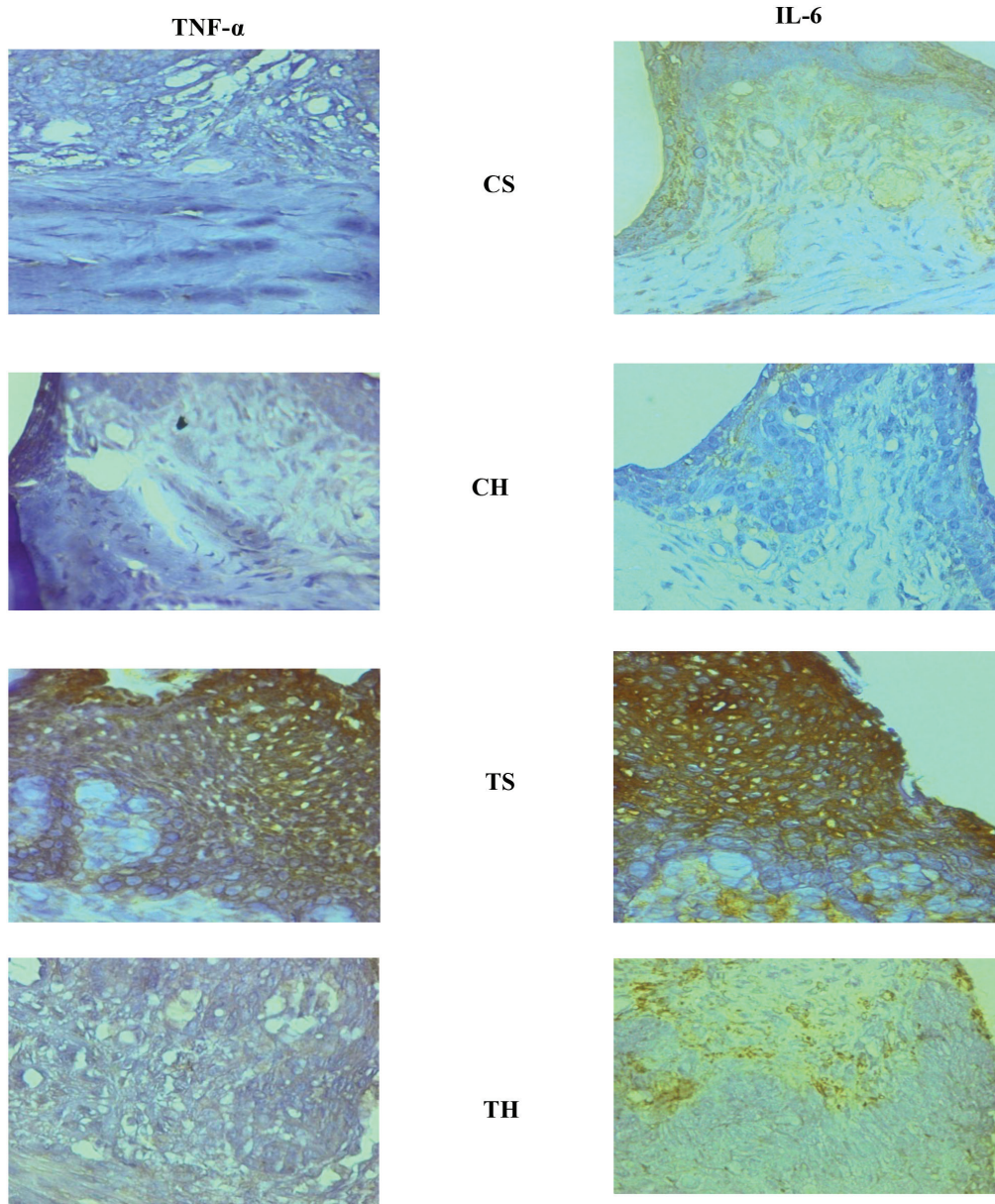
EKSPRESI IL-6 DAN TNF- α PADA PERIODONTIUM

Rajah 3 menunjukkan histologi tisu periodontium kesemua kumpulan kajian pada pembesaran 400 \times . Rajah menunjukkan histologi tisu periodontium kumpulan TS dengan kelihatan intensiti pewarnaan yang tinggi berbanding dengan kumpulan TH. Pewarnaan positif TNF- α yang berwarna coklat pada epitelium dan tisu penghubung

adalah tinggi pada kumpulan TS dan pewarnaan positif didapati berkurang pada kumpulan TH. Tiada pewarnaan positif didapati pada kumpulan kawalan CS dan CH.

Rajah 3 juga menunjukkan pewarnaan IL-6 pada tisu periodontium. Terdapat pewarnaan positif yang berwarna coklat pada sel epitelium tisu gingiva kumpulan CS dan CH tanpa melibatkan tisu penghubung. Pewarnaan positif pada kumpulan CH dilihat berkurang berbanding dengan kumpulan CS. Pewarnaan positif yang tinggi pada sel epitelium tisu periodontium dan juga tisu penghubung tisu ligamen periodontium kumpulan TS. Terdapat pengurangan pewarnaan positif pada tisu periodontium pada kumpulan TH berbanding dengan kumpulan TS.

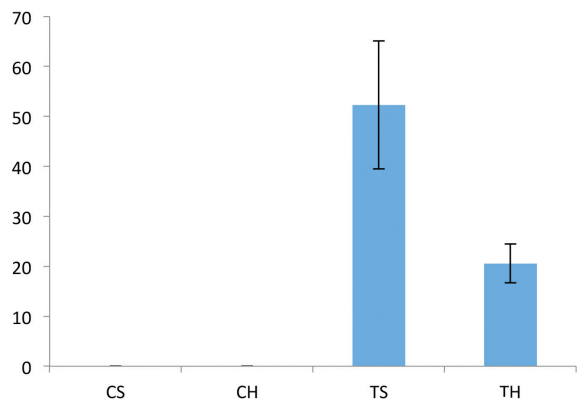
Rajah 4 menunjukkan ekspresi TNF- α pada tisu periodontium kesemua kumpulan tikus kajian. Graf menunjukkan ekspresi TNF- α pada kumpulan ujian, TS adalah tinggi secara signifikan berbanding dengan kumpulan ujian, TH serta kumpulan kawalan, CS dan CH. Terdapat perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) antara kumpulan TH berbanding dengan kumpulan kawalan, CS dan CH. Rajah 5 menunjukkan ekspresi IL-6 pada tisu periodontium gigi molar pertama semua kumpulan tikus kajian. Graf menunjukkan ekspresi IL-6 pada kumpulan ujian, TS adalah tinggi secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan kumpulan ujian, TH serta kumpulan kawalan. Tiada perbezaan yang signifikan pada



CS: kawalan salin; CH: kawalan madu Gelam; TS: periodotitis salin dan TH: periodontitis madu Gelam

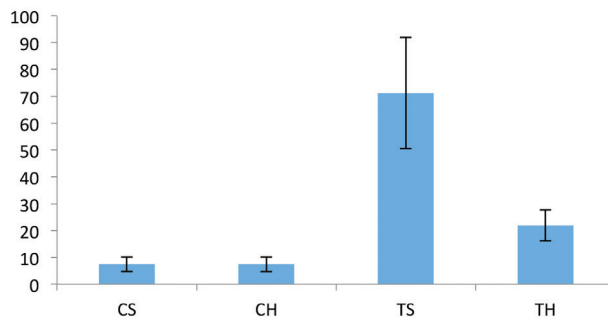
RAJAH 3. Gambar menunjukkan histologi pewarnaan imunohistokimia tisu mandibel bagi TNF- α dan IL-6 pada pembesaran 400 \times

ekspresi IL-6 pada tisu periodontium kumpulan TH dengan kumpulan kawalan.



Nilai dinyatakan dalam purata ± ralat piawai
 a= Perbezaan signifikan dengan kumpulan CS, nilai $p < 0.05$; b= Perbezaan signifikan dengan kumpulan CH, nilai $p < 0.05$; c= Perbezaan signifikan dengan kumpulan TS, nilai $p < 0.05$

RAJAH 4. Graf menunjukkan ekspresi TNF- α pada tisu mandibel semua kumpulan tikus

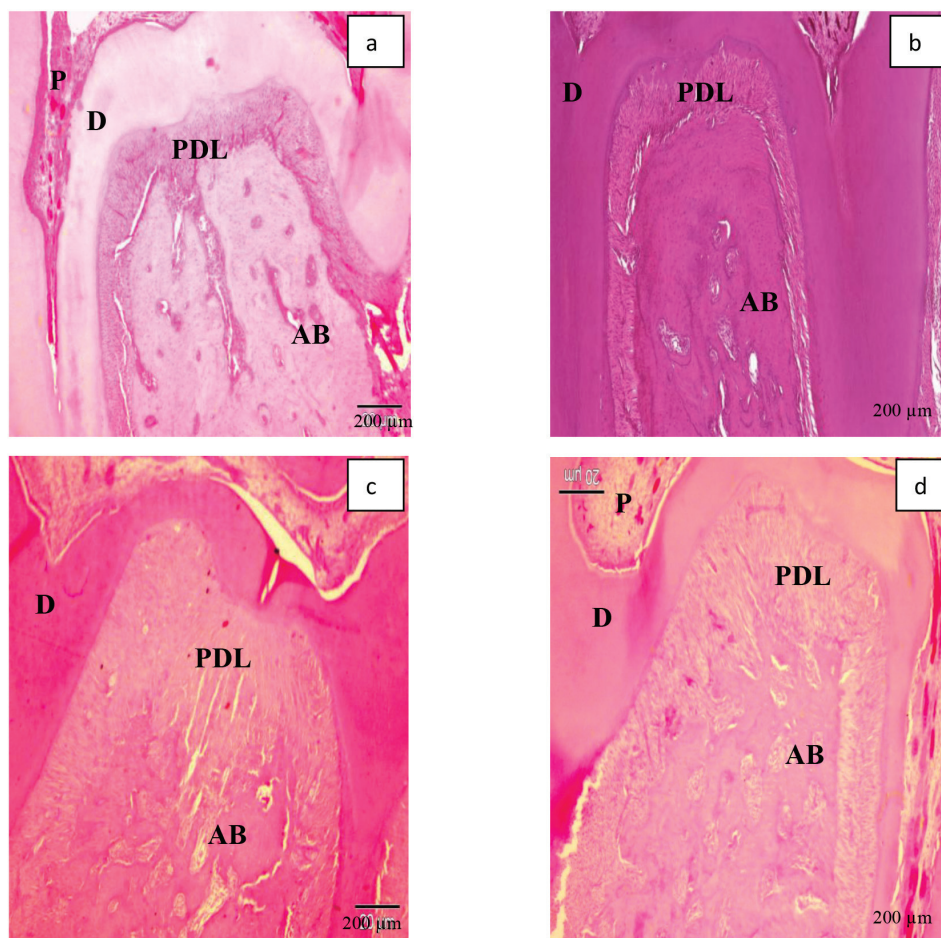


Nilai dinyatakan dalam purata ± ralat piawai
 a= Perbezaan signifikan dengan kumpulan CS, nilai $p < 0.05$; b= Perbezaan signifikan dengan kumpulan CH, nilai $p < 0.05$; c= Perbezaan signifikan dengan kumpulan TS, nilai $p < 0.05$

RAJAH 5. Graf menunjukkan ekspresi IL-6 pada tisu mandibel semua kumpulan tikus

KEHILANGAN TULANG PADA KAWASAN FURKASI

Rajah 6 menunjukkan kawasan furkasi kesemua tikus kajian selepas 15 hari kajian. Rajah 6(a) dan 6(b) menunjukkan histologi periodontium yang normal pada kumpulan kawalan CS (a) dan CH (b), tiada inflamasi berlaku dan

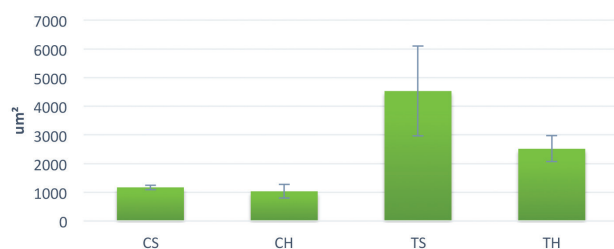


RAJAH 6. Pewarnaan H & E pada tisu periodontium kawasan furkasi tikus kawalan CS (a), tikus kawalan CH (b), tikus teraruh periodontitis TS (c) dan tikus teraruh periodontitis dengan madu Gelam TH (d). D : Dentin; PDL : Ligamen periodontium; AB : Tulang alveolar; P : Pulpa. Tikus pada kumpulan TS (c) menunjukkan tulang alveolar jauh daripada dinding dentin pada kawasan furkasi

kawasan furkasi tersebut adalah terdiri daripada tisu periodontium. Bagi kumpulan tikus periodontitis yang diberi madu Gelam TH, morfologi tisu periodontium adalah hampir menyerupai kumpulan tikus kawalan, namun, luas kawasan berlakunya inflamasi adalah signifikan berbanding dengan luas kawasan furkasi tikus kawalan. Merujuk kepada Rajah 6(d) luas kawasan furkasi molar pertama tikus kajian, TH adalah lebih besar dibandingkan dengan kumpulan kawalan. Ini menunjukkan terdapat kehilangan tulang berlaku pada kumpulan TH berbanding dengan kumpulan kawalan.

Merujuk kepada Rajah 7, graf menunjukkan kehilangan tulang alveolar pada kawasan furkasi pada kumpulan TS dan TH. Luas kawasan furkasi pada kumpulan kawalan, CS dan CH merupakan ruang tisu periodontium.

Pembesaran 40×



Nilai dinyatakan dalam purata ± purata ralat piawai. Tiada perbezaan signifikan antara kumpulan kumpulan TS dan TH

a Perbezaan signifikan dengan kumpulan CS, nilai $p < 0.05$

b Perbezaan signifikan dengan kumpulan CH, nilai $p < 0.05$

RAJAH 7. Graf menunjukkan luas kawasan furkasi kesemua kumpulan tikus kajian

PERBINCANGAN

Secara amnya, inflamasi pada tisu setempat akan merangsang perubahan aras sitokin pro-inflamasi pada peredaran darah dan dalam kes ini, aras sitokin pro-inflamasi akan meningkat sewaktu periodontitis berlaku. Namun, keputusan daripada kajian ini menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan pada aras IL-6 dan TNF- α dalam plasma kesemua kumpulan tikus kajian selepas 15 hari aruhan. Keputusan kajian ini adalah selaras dengan kajian yang dijalankan oleh Aziz et al. (2014), dengan aruhan periodontitis turut dilakukan selama 15 hari yang menunjukkan tiada perubahan yang signifikan pada aras IL-1 dalam plasma pada kesemua tikus kajian. Penyelidikan ini turut menyokong kajian yang dilakukan oleh Luo et al. (2014) yang menunjukkan tiada perubahan yang signifikan pada aras sitokin seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α dalam serum tikus periodontitis berbanding dengan kumpulan tikus normal. Model kajian tersebut adalah sama dengan kajian semasa dengan molar tikus diikat dengan menggunakan benang bersaiz 4/0 selama dua minggu. Namun, terdapat beberapa faktor yang menyebabkan tiada perubahan pada aras IL-6 dan TNF- α dalam plasma. Antaranya adalah masa aruhan yang pendek (Endo et al. 2010; Liao et al. 2014) menyebabkan tiada perbezaan yang signifikan dapat

dilihat. Selain itu, saiz benang yang berlainan (Xie et al. 2011) turut mempengaruhi keputusan kerana saiz benang yang lebih besar (3/0) yang digunakan dalam kajian Ekuni et al. (2009) menunjukkan perubahan yang signifikan pada aras penanda inflamasi pada plasma berbanding dengan kajian ini yang menggunakan benang yang lebih kecil (4/0).

Selain itu, pengikatan yang melibatkan ikatan hanya pada satu molar sahaja mungkin tidak cukup untuk memberi perubahan yang signifikan kepada aras penanda inflamasi IL-6 dan TNF- α dalam plasma. Kebanyakan kajian aruhan periodontitis melibatkan ikatan pada satu molar gigi, namun tempoh kajian yang menunjukkan perubahan yang signifikan pada aras penanda inflamasi pada plasma adalah melebihi 15 hari (Ku et al. 2010; Liu et al. 2010). Kajian yang melibatkan ikatan pada lebih dari satu molar memberi keputusan yang signifikan (Kose et al. 2016; Ma et al. 2010).

Dalam kajian ini terdapat kehadiran ekspresi IL-6 dan TNF- α pada tisu mandibel tikus kawalan, CS dan CH. Kemungkinan ini adalah disebabkan oleh prosedur rutin makmal dan pemberian madu Gelam dan larutan salin normal secara oral gavaj menyebabkan tekanan dan merangsang inflamasi berlaku pada tikus tersebut (Balcombe et al. 2004). Limitasi ini boleh diatasi dengan mengurangkan persekitaran yang boleh memberi tekanan kepada tikus serta meningkatkan kamahiran dalam pengendalian haiwan seperti semasa pemberian oral gavaj bagi mengurangkan tekanan.

Pengambilan madu Gelam secara oral gavaj merencat aktiviti IL-6 dan TNF- α pada tisu gingiva pada tikus teraruh periodontitis selama 15 hari. Kesan anti-inflamasi madu Gelam berkepekatan 3 g/mL yang diperhatikan dalam kajian ini sama seperti kajian yang dilakukan oleh Aziz et al. (2014). Kajian tersebut menunjukkan pemerhatian yang sama dengan madu Gelam menurunkan aktiviti sitokin pro-inflamasi IL-1 pada model periodontitis. Keputusan ini turut menyokong kajian yang dilakukan oleh Hussein et al. (2012) yang menunjukkan fungsi madu Gelam dalam menurunkan aktiviti sitokin pro-inflamasi seperti IL-6 dan TNF- α pada tisu inflamasi.

Berdasarkan keputusan daripada kajian ini juga didapati penggunaan madu Gelam tidak memberi kesan terhadap penurunan kehilangan tulang. Keputusan ini menyokong kajian yang dilakukan Hamzah et al. (2014) tentang kesan madu Gelam terhadap kehilangan tulang alveolar pada tikus periodontitis dengan suplementasi madu Gelam tidak merencat kehilangan tulang pada kawasan interdental tikus periodontitis.

Keputusan ini juga adalah selari dengan kajian yang dilakukan oleh Guimarães et al. (2011) yang menunjukkan kurkumin tidak memberi kesan terhadap kehilangan tulang alveolar pada tikus yang diaruh periodontitis selama 15 hari. Masa rawatan perlu dipanjangkan bagi melihat kesan madu Gelam dalam merencat kehilangan tulang pada tikus periodontitis. Menurut kajian yang dijalankan oleh Kuhr et al. (2004), kehilangan tulang alveolar adalah paling tinggi pada hari ke-15 dan menjadi tetap sehingga hari ke-60.

Pemanjangan masa rawatan periodontitis dengan madu Gelam mungkin mampu mengelakkan kehilangan tulang daripada berlaku.

Selain dari masa aruhan, kepekatan madu Gelam yang digunakan dalam kajian ini turut mempengaruhi kesan terhadap kehilangan tulang. Kajian yang dilakukan oleh Toker et al. (2008) yang menggunakan propolis sebagai agen rawatan melaporkan propolis dapat mengurangkan kehilangan tulang alveolar pada tikus periodontitis selepas 11 hari rawatan. Perbezaan kandungan pada madu Gelam dan propolis mungkin menjadi salah satu faktor terhadap kesan pada penurunan kehilangan tulang. Oleh yang demikian, kepekatan madu Gelam perlu ditingkatkan bagi melihat kesan yang efektif dalam pengurangan tulang pada tikus periodontitis selain memanjangkan masa aruhan.

KESIMPULAN

Keputusan kajian ini mencadangkan bahawa madu Gelam mampu menurunkan ekspresi IL-6 dan TNF- α secara langsung pada tisu periodontium dalam kumpulan TH berbanding kumpulan TS, namun tidak secara sistemik dan tidak mengurangkan kehilangan tulang.

RUJUKAN

- Assuma, R., Oates, T., Cochran, D., Amar, S. & Graves, D.T. 1998. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *Journal of Immunology* 160(1): 403-409.
- Aziz, A.S., Hamzah, N., Fauzi, A.R., Mohd Yusoff, Y.A., Ibrahim, N., Abdul Rahman, M., Abdul Ghafar, N. & Baharin, B. 2014. The effect of Gelam (*Melaleuca cajuputi*) honey on inflammatory mediators in periodontitis-induced Sprague-Dawley rats. *International Journal of Applied Research in Natural Products* 7(3): 7-16.
- Baker, P.J., Dixon, M., Evans, R.T., Dufour, L., Johnson, E. & Roopenian, D.C. 1999. CD4 + T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice CD4⁺ T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice. *Infection and Immunity* 67(6): 2804-2809.
- Balcombe, J.P., Barnard, N.D. & Sandusky, C. 2004. Laboratory routines cause animal stress. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sc.* 43(6): 42-51.
- Ekuni, D., Tomofuji, T., Sanbe, T., Irie, K., Azuma, T., Maruyama, T. & Yamamoto, T. 2009. Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. *Journal of Periodontal Research* 44(4): 434-442.
- Endo, Y., Tomofuji, T., Ekuni, D., Irie, K., Azuma, T., Tamaki, N. & Morita, M. 2010. Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. *Journal of Periodontology* 81(4): 520-526.
- Garlet, G.P., Cardoso, C.R. & Campanelli, A.P. 2007. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: Host protection and tissue destruction. *Clin. Exp. Immunol.* 147: 128-138.
- Graves, D. 2008. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J. Periodontol.* 79(8 Suppl): 1585-1591.
- Graves, D.T., Delima, A.J., Assuma, R., Amar, S., Oates, T. & Cochran, D. 1998. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *J. Periodontol.* 69: 1419-1425.
- Hamzah, N., Aziz, S.A., Fauzi, A.R., Yusof, Y.A.M., Razali, M., Ibrahim, N. & Baharin, B. 2014. Effects of Gelam honey (*Melaleuca cajuputi*) on alveolar bone loss in experimental periodontitis. *Journal of Dental Surgery* 2013: Article ID. 907970.
- Hussein, S.Z., Mohd Yusoff, K., Makpol, S. & Mohd Yusof, Y.A. 2012. Gelam honey inhibits the production of proinflammatory mediators NO, PGE 2, TNF- α , and IL-6 in carrageenan-induced acute paw edema in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 1-13.
- Kassim, M., Achoui, M., Mansor, M. & Yusoff, K.M. 2010. The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E2 in inflammatory tissues. *Fitoterapia* 81(8): 1196-1201.
- Khosravi, R., Ka, K., Huang, T., Khalili, S., Nguyen, B.H., Nicolau, B. & Tran, S.D. 2013. Tumor necrosis factor- α and interleukin-6: Potential interorgan inflammatory mediators contributing to destructive periodontal disease in obesity or metabolic syndrome. *Mediators of Inflammation* 2013: 728987.
- Kuhr, A., Popa-Wagner, A., Schmoll, H., Schwahn, C. & Kocher, T. 2004. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research* 39(2): 101-106.
- Kose, O., Arabaci, T., Yemenoglu, H., Kara, A., Ozkanlar, O., Kayis, S. & Duymus, Z.Y. 2016. Influences of fucoxanthin on alveolar bone resorption in induced periodontitis in rat molars. *Marine Drugs* 14(4): 1-11.
- Liao, C.H., Fei, W., Shen, Z.H., Yin, M.P. & Lu, C. 2014. Expression and distribution of TNF- α and PGE2 of periodontal tissues in rat periodontitis model. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7(5): 412-416.
- Liu, L., Li, C., Cai, X., Xiang, J., Cao, Z. & Dong, W. 2010. The temporal expression and localization of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRN) during the development of periodontitis in an animal model. *Journal of Periodontal Research* 45(4): 541-549.
- Luo, K., Ma, S., Guo, J., Huang, Y., Yan, F. & Xiao, Y. 2014. Association between postmenopausal osteoporosis and experimental periodontitis. *BioMed Research International* 2014: 316134.
- Mueller, M., Hobiger, S. & Jungbauer, A. 2010. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry* 122(4): 987-996.
- Toker, H., Ozan, F., Ozer, H., Ozdemir, H., Eren, K. & Yeler, H. 2008. A morphometric and histopathologic evaluation of the effects of propolis on alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontology* 79(6): 1089-1094.
- Williams, D.M., Hughes, F.J., Odell, E.W. & Farthing, P.M. 2002. *Pathology of Periodontal Disease*. Oxford: Oxford University Press. pp. 2-3.
- Xie, R., Kuijpers-Jagtman, A.M. & Maltha, J.C. 2011. Inflammatory responses in two commonly used rat models for experimental tooth movement: Comparison with ligature-induced periodontitis. *Archives of Oral Biology* 56(2): 159-167.

Affah-Radiyah Fauzi* & Mariati Abdul Rahman
Jabatan Biologi Mulut dan Klinikal, Fakulti Pergigian
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan
Malaysia

Saliana A. Aziz, Norashikin Hamzah & Badiyah Baharin
Jabatan Periodontologi, Fakulti Pergigian
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan
Malaysia

Norzana Abdul Ghafar
Jabatan Anatomi, Fakulti Perubatan
Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Yaacob Latif
56000 Cheras, Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan
Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: afifahradiyah@yahoo.com.my

Diserahkan: 26 April 2016

Diterima: 14 Oktober 2016