

## ANALISIS MOLEKULER EKSPRESI ANOMALI PROTEIN MUKOSA MULUT PADA *RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS (RAS)*

Diah Savitri Ernawati, Siti Soemarijah,\* Yoes Prijatna Dachlan\*\*

\*Department of Oral Medicine Faculty of Dentistry, Airlangga University

\*\*Tropical Disease Centre, Airlangga University

### Abstract

#### The Molecular Analysis on the Expression of Oral Mucosa Protein Anomaly in Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)

The purpose of this study was to disclose one of the etiopathogenesis of recurrent aphthous stomatitis (RAS) at molecular level by analyzing the expression of protein anomaly in oral mucosa. This was a cross-sectional explorative and analytic observational study. Samples, who met inclusion and exclusion criteria, were taken from total population. Samples of protein swab were obtained from oral mucosa, serum were taken from 15 patients with major RAS, 20 patients with minor RAS and 15 were control. The characterization of protein anomaly expressed on the surface of oral mucosa epithelium was carried out using SDS-PAGE 12% and Westernblot methods. The result of oral mucosa protein anomaly expression analysis in patients with major RAS using SDS-PAGE 12% revealed five protein bands with molecular weights of 87, 65, 30, 25, and 20 kDa. In minor RAS cases with protein anomaly expression there were four proteins with molecular weights of 87, 65, 25, and 20 kDa, and the protein in remission RAS had four proteins bands with molecular weight of 87, 65, 25 and 20 kDa. The band disappearances by using Westernblot test, of 30 kDa of major cases, 87 and 20 kDa of minor cases and 20 and 25 kDa of remission cases, indicated that those patients were not reacted with polyclonal antibodies of rabbit serum; therefore they had no role in the induction of RAS. In conclusion, the antigenic protein expressed in oral mucosa of major, minor, and remission RAS was predominantly 65 kDa molecular weight. *Indonesian Journal of Dentistry 2006; Edisi Khusus KPPIKG XIV: 215-220*

Key words: protein anomaly; RAS

### Pendahuluan

Penyakit *Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)* merupakan penyakit pada jaringan lunak rongga mulut berupa ulser yang timbulnya secara kambuhan. Penyakit ini tidak ganas tetapi keberadaannya di rongga mulut merupakan masalah tersendiri bagi penderita dan sangat mengganggu karena keluhan rasa sakit yang hebat sehingga mengakibatkan kesulitan dalam berbicara, makan, serta menimbulkan bau mulut yang tidak enak, dan

penyakit ini dapat mempengaruhi estetika bila terjadi pada daerah bibir. Penyakit ini secara epidemiologi tidak mengenal batasan, umur, jenis kelamin, genetik, dan bahkan ditemukan di seluruh dunia.<sup>1,2</sup>

Prevalensi RAS cukup tinggi, terbukti dari hasil penelitian di berbagai dunia menunjukkan angka bervariasi antara 17% - 66% dari populasi tertentu.<sup>3</sup> Hasil penelitian di Thailand menyebutkan bahwa prevalensi RAS cukup tinggi yaitu 46,7%.<sup>4</sup> Dari tahun 1991 - 1995 di klinik Ilmu Penyakit Mulut FKG-Unair dijumpai 2663 penderita RAS dari 4487

penderita yang datang. Dari tahun 1996 - 2000 dijumpai 1808 penderita RAS.<sup>5,6</sup> Distribusi usia pada semua kelompok umur mulai anak-anak sampai dewasa. Tampaknya predileksi terbanyak terjadi pada wanita. Pernah dilaporkan bahwa 56% dari penderita adalah wanita dan usia yang banyak terlihatnya ulser adalah antara 19 - 30 tahun.<sup>1</sup>

Secara klinis ulser timbul pada permukaan mukosa rongga mulut yang *non keratinized*, misalnya, mukosa bukal, mukosa labial, permukaan ventral lidah, dasar mulut dan palatum molle, juga pada permukaan dorsum lidah, sedangkan pada perlekatan gusi atau palatum durum jarang sekali timbul ulser tersebut. Hasil penelitian Ernawati menunjukkan bahwa kasus RAS lokasi terbesar (sekitar 80%) adalah pada mukosa labial dan mukosa bukal, sedangkan pada daerah mukosa palatum durum, gingiva, atau pun daerah yang mengalami keratinisasi jarang ditemukan.<sup>5</sup> Lesi dapat berbentuk bulat atau oval dengan diameter sampai sepuluh milimeter, satu ulser atau banyak, terasa nyeri, dan dapat sembuh sendiri setelah dua sampai empat minggu, dengan atau tanpa pembentukan jaringan parut, tergantung kepada macam variasi ulser tersebut.<sup>1</sup>

Etiopatologi RAS sampai saat ini belum diketahui dengan jelas karena banyak faktor lokal dan sistemik yang berpartisipasi dalam patogenesis RAS.<sup>7,8</sup> Beberapa hasil penelitian mengindikasikan adanya *immunological disorder* yang terletak di antara komponen regulator dan efektor sistem imun.

RAS merupakan suatu kondisi kerusakan pada epitelium yang kemungkinan diakibatkan oleh faktor eksternal (seperti trauma, infeksi bakteri, infeksi virus) dan faktor internal (seperti genetik, hormonal, gangguan sistem imun, defisiensi hematinik, penyakit gastrointestinal, alergi makanan, dan psikis). Faktor-faktor yang berkaitan dengan RAS dapat bertindak sebagai agen yang akan membentuk ikatan kompleks dengan epitel mukosa mulut.<sup>1</sup>

Adanya anomali protein mukosa yang dapat memodulasi reaksi yang berlebihan secara lokal kemungkinan dapat berperan sebagai salah satu faktor pemicu awal timbulnya *Recurrent Aphthous Stomatitis*. Hal ini sesuai dengan penelitian *Sistig*, bahwa pada RAS ditemukan antibodi secara sistemik terutama IgG, dan IgA pada saat fase akut.<sup>10</sup> Menurut McNally, sistem imun yang tersensitisasi oleh protein yang terdapat pada daerah spesifik di rongga mulut, kemungkinan akan mengakibatkan disregulasi respons imun yang akhirnya dapat menimbulkan ulser pada mukosa mulut.<sup>11</sup>

Sampai saat ini telah banyak penelitian yang mengarah pada temuan mekanisme patogenesis RAS,

tetapi sampai sekarang masih belum ada hipotesis jelas yang berkaitan dengan mekanisme secara molekuler ekspresi anomali protein. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk menganalisis secara molekuler ekspresi anomali protein mukosa mulut yang berperan pada timbulnya RAS

## Bahan dan Cara Kerja

Bahan penelitian adalah protein mukosa mulut dan serum yang dikumpulkan dari pasien RAS dan non RAS di bagian *Oral Medicine* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah *tris-HCL*, *glycin*, *sodium dodecyl sulphat*, *acrylamid*, *bisacrylamid*, *ammonium persulphat*, TEMED, H<sub>2</sub>O, metanol, glutaraldehid, alkohol, gliserin, PBS, e-buffer, perak nitrat (AgNO<sub>3</sub>), *Fast Red*, konjugat IgG *anti rabbit*, konjugat *anti human*, membran nitroselulose, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OPD, *acetic acide*, NaOH, formaldehid, butanol, *zitroen znure*, selofan, *microplate* tipe 200 µl, 1000 µl, dan *mouse MonoAB-ID Kit (HRP)*.

## Koleksi Sampel Protein Mukosa Mulut

Sampel diperoleh dari penderita RAS yang sesuai dengan kriteria sampel. Sampel diambil dengan cara melakukan kerokan (*swab*) pada mukosa mulut. Hasil *swab* dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 400 µl yang sudah berisi medium MEM tanpa serum, kemudian disimpan pada *freezer* -20 °C. Setelah sampel terkumpul selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 40.000 rpm selama 5 jam dengan tempertur 10 °C. Setelah itu supernatan dibuang dan peletnya disuspensikan dengan PBS, selanjutnya dilakukan dialisis agar didapatkan protein murni. Dialisis protein atau sampel dilakukan dengan cara memasukkan sampel ke dalam selofan kemudian dimasukkan ke dalam PBS dengan pH 8,2 dan diputar dengan *shaker* yang didalamnya terdapat *magnetic bar*, kemudian diputar dengan kecepatan lambat selama 24 jam dan ditempatkan pada temperatur 4°C. Setelah itu sampel dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf dan disimpan

Sampel penelitian adalah 35 penderita RAS dan 15 penderita non RAS yang datang ke bagian *Oral Medicine* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya. Unit analisis adalah protein mukosa hasil *swab* pada mukosa mulut yang telah dilakukan purifikasi dengan sephadex G 125 kromatografi dan serum penderita RAS.

Kriteria penderita yang diambil sebagai sampel adalah penderita *RAS*: a) Umur 10-60 tahun, b) pernah mengalami ulserasi 3 kali atau lebih pertahun, c) mukosa mulut tanpa kelainan atau keradangan kecuali lesi *RAS*, dan d) diameter ulser > 3 mm. Kriteria penderita non *RAS* adalah a) umur 10-60 tahun, b) mukosa mulut sehat, dan c) tanpa adanya radang atau lesi lain pada mukosa mulut.

#### Sodium Dodecyl Sulphat-Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Protein hasil pemurnian dengan sistem sephadex G 125 kemudian dicampur larutan laemli buffer dengan perbandingan 1:3 dan selanjutnya dimasukkan ke *waterbath* pada temperatur 100°C selama 5 menit. Suspensi sampel tersebut kemudian dimasukkan ke dalam gel poliakrilamid konsentrasi 12 %. Elektroforesis dijalankan pada voltase 150 dengan 40 mA. Akhirnya hasil SDS-PAGE dari protein sampel divisualisasikan dengan pengecatan *silver nitrat* ( $\text{AgNO}_3$ ). Selanjutnya dilakukan identifikasi molekul protein berdasarkan berat molekulnya.<sup>12,13</sup>

#### Straiffing Westernblot

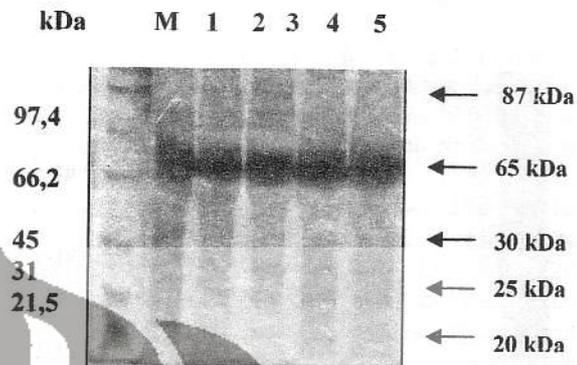
Protein *RAS* dengan analisis SDS-PAGE 12 % masih belum teridentifikasi dengan spesifik. Oleh karena itu perlu dilakukan uji spesifisitas dengan cara *westernblot*. Sampel yang sudah di-*running* dengan elektroforesis tanpa dilakukan pewarnaan, kemudian ditransfer ke membran nitroselulose menggunakan 40 mA dan volt 150. Proses ini berlangsung 1,5 jam. Setelah ditransfer ke membran nitroselulose, dipotong sebesar 3 mm, kemudian masukkan potongan-potongan tersebut ke dalam parit (*slot*) dan di-*blocking* dengan BSA 1% selama 1 jam lalu dicuci dengan PBS Tween 0,05 %, setelah itu direaksikan dengan serum penderita *RAS* selama 18 jam. Dicuci kembali dan direaksikan dengan konjugat fragmen imunoglobulin G anti manusia. Penentuan spesifisitas protein di visualisasikan dengan pewarnaan *fast-red*, dengan demikian akan didapatkan protein spesifik *RAS* dengan berat molekul tertentu, selanjutnya dilakukan purifikasi protein spesifik.<sup>12,13</sup>

#### Hasil

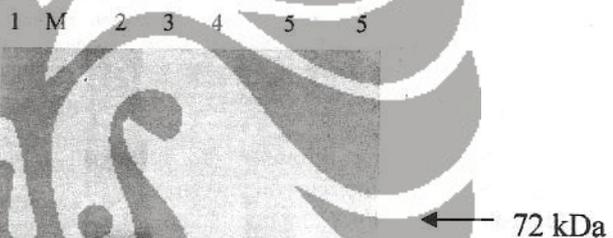
##### Analisis Berat Molekul Anomali Protein

Hasil fraksinasi protein melalui sephadex kromatografi yang telah dikoleksi, selanjutnya semua fraksinasi protein dicampur dan berat

molekul protein dianalisis dengan menggunakan SDS-PAGE 12%. Setelah dilakukan visualisasi dengan menggunakan  $\text{AgNO}_3$  ditemukan beberapa pita protein seperti pada Gambar 1 di bawah ini.



Gambar 1. Analisis berat molekul protein dengan SDS-PAGE 12% dari protein hasil kromatografi yang dicampur. Lajur M: *marker*, Lajur 1-2: Campuran fraksi pemurnian protein mayor, lajur 3-4: Campuran fraksi pemurnian protein minor, lajur 5: Campuran fraksi pemurnian protein remisi. Visualisasi protein dilakukan pengecatan dengan *silver nitrat* ( $\text{AgNO}_3$ ).

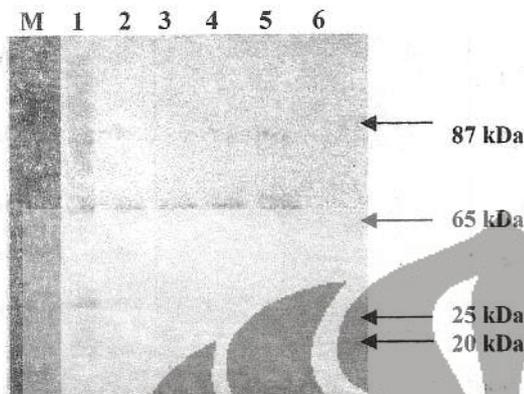


Gambar 2. Hasil analisis SDS-PAGE 12 % pada penderita non *RAS* pada lajur no 2 Lajur M: *marker*. Lajur 1: minor, lajur 3: mayor, lajur 4: remisi

Setelah dilakukan pengecatan dengan *silver nitrat* ( $\text{AgNO}_3$ ) menunjukkan adanya beberapa pita pada semua lajur. Pada lajur 1 dan 2 sampel campuran fraksi protein 87 kDa, 65 kDa, 25 kDa dan 20 kDa. Hasil analisis SDS-PAGE di atas menunjukkan bahwa anomali protein yang di ekspresikan secara signifikan tidak berbeda di antara kasus *RAS*, walaupun pada kasus mayor ditemukan

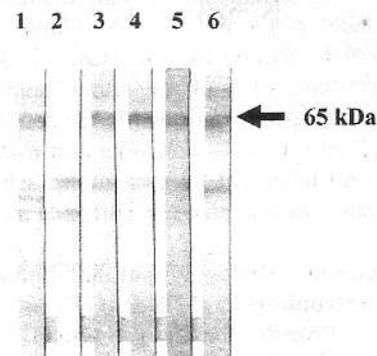
protein yang diekspresikan secara kualitatif tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Protein ini selanjutnya dianalisis dengan *immunoblotting* yang hasilnya seperti pada Gambar 3 di bawah ini



Gambar 3. Analisis protein spesifik dengan *Westernblot*. Lajur M: *marker*. Lajur 1: campuran protein dari *RAS* mayor yang diekstraksi dengan phenol, lajur 2 : Campuran protein mayor, lajur 3-4: Campuran protein dari *RAS* minor, lajur 5: protein remisi, lajur 6: sampel kontrol negatif. Selanjutnya direaksikan dengan serum yang mengandung antibodi anti anomali protein dengan titer 1:10.000 (data lengkap tidak ditampilkan), kemudian direaksikan dengan antibodi kedua (konjugat) Fab yang dilabel dengan fosfatase alkali, dan akhirnya divisualisasikan dengan pewarnaan *Fast-Red*.

Protein yang ditransfer ke membran nitro-selulose dan kemudian dilakukan analisis protein dengan *Westernblot* menunjukkan, bahwa tidak semua protein dapat bereaksi dengan antibodi poliklonal *anti whole protein* dalam serum kelinci. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 3. pita yang dapat bereaksi dengan antibodi poliklonal adalah protein yang berasal dari kasus *RAS* mayor ditemukan empat macam pita protein dengan berat molekul 20 kDa, 25 kDa, 65 kDa dan 87 kDa, sedangkan pada protein yang berasal dari kasus *RAS* minor hanya ditemukan dua macam pita protein yaitu protein dengan berat molekul 65 kDa dan 25 kDa walaupun sangat tipis, tetapi protein yang berasal dari kasus *RAS* remisi ditemukan dua macam protein yang mempunyai berat molekul beda dengan kasus *RAS* minor yaitu ditemukan protein dengan berat molekul 65 kDa dan 87 kDa. Hasil ini menunjukkan bahwa protein yang nampak setelah dilakukan analisis *Westernblot* mempunyai arti penting dalam respons imun. Oleh karena itu selanjutnya dilakukan analisis *straffing blotting* yang direaksikan dengan antibodi pasien yang berbeda.



Gambar 4. Analisis *Straffing Westernblot* protein mukosa mulut spesifik *RAS*. Selanjutnya direaksikan dengan antibodi poliklonal dari masing-masing pasien dengan menggunakan konjugat Fab IgG anti human menunjukkan adanya bands spesifik 65 kDa dengan reaktivitas yang tinggi.

Hasil pada Gambar 4 menunjukkan hasil yang signifikan bahwa protein anomali dengan berat molekul 65 kDa dapat menginduksi respons imun dan mempunyai sifat yang dominan. Pada lajur satu terlihat bahwa pita protein bereaksi positif dengan antibodi poliklonal dari serum pasien *RAS* mayor. Sedang pada lajur dua tidak bereaksi positif dengan antibodi poliklonal dari pasien non *RAS*. Pada lajur lima dan enam menunjukkan reaksi positif dengan antibodi poliklonal dari serum pasien yang remisi. Sedang lajur tiga dan empat menunjukkan adanya reaktivitas antibodi dari semua pasien *RAS* minor.

## Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian ditemukan beberapa macam protein spesifik *RAS* dengan berat molekul yang berbeda. Timbulnya anomali protein pada *RAS* kemungkinan disebabkan dua mekanisme yaitu melalui jalur enzim polimerase II dan melalui jalur protein kinase. Mekanisme ini berkaitan dengan gambaran klinis dari *RAS* seperti pada *RAS* mayor, minor dan remisi. Jalur enzim polimerase II ini diawali dengan aktifnya enzim polimerase II yang akan menyebabkan peningkatan asam glutamin dan asparagin, sedang aktifnya protein kinase akan meningkatkan pembentukan protein pada fase translasi yang berpengaruh terhadap ikatan gugus  $\text{NH}_2$  dan  $\text{COOH}$  siklus multiplikasi sel, yang dapat mengakibatkan perubahan struktur primer protein pada mukosa mulut menjadi anomali protein.<sup>14,15</sup>

Hasil analisis ekspresi protein mukosa mulut pada penderita *RAS* mayor dengan menggunakan SDS-PAGE 12 %, ditemukan lima pita protein

dengan berat molekul 87 kDa, 65 kDa, 30 kDa, 25 kDa, dan 20 kDa. Selanjutnya protein tersebut dianalisis dengan *Westernblot* menggunakan serum poliklonal dari kelinci yang sudah diimunisasi dengan *whole* anomali protein anti *RAS*. Ternyata menunjukkan sifat yang berbeda, terutama sifat yang tampak adalah reaktivitas protein tersebut terhadap antibodi poliklonal. Bahkan beberapa protein yang ditemukan pada SDS-PAGE 12% tidak mempunyai reaktivitas terhadap antibodi poliklonal anti protein anomali setelah dianalisis dengan *Westernblot* (data lengkap tidak ditampilkan)

Pita protein dengan BM 30 kDa tidak bereaksi dengan antibodi poliklonal karena pertama, kemungkinan di dalam serum kadar antibodi sangat rendah, dan kedua adalah protein tersebut tidak mempunyai sifat antigenik sehingga tidak dapat menginduksi antibodi. Hasil keempat protein setelah dilakukan analisis *Westernblot* menunjukkan protein 65 kDa mempunyai sifat dominan dibandingkan dengan protein lainnya yang berarti bahwa protein tersebut mempunyai antigenitas yang baik sehingga dapat menginduksi antibodi dengan titer yang tinggi. Hal ini berkaitan dengan protein yang diekspresikan pada permukaan sel epitel mukosa mulut, jika protein tersebut di ekspresikan terus menerus dalam jumlah yang banyak maka stimulasi terhadap respons antibodi juga semakin meningkat, karena memori klon sel imun terus bertambah.

Pada kasus *RAS* minor ekspresi protein dengan analisis SDS-PAGE ditemukan empat macam protein dengan berat molekul 87 kDa, 65 kDa, 25 kDa, dan 20 kDa. Protein tersebut sama dengan protein yang ditemukan pada kasus mayor, sedangkan protein yang mempunyai BM 30 kDa tidak ditemukan pada kasus *RAS* minor. Protein ini kemungkinan mempunyai peranan yang penting pada berbagai kasus *RAS*, dan kemungkinan dapat digunakan sebagai pembeda diantara tipe *RAS*.

Sifat reaktivitas protein pada *RAS* minor setelah direaksikan dengan antibodi poliklonal anti protein anomali dengan cara *Westernblot* menunjukkan, bahwa protein 65 kDa dan 25 kDa mempunyai reaktivitas yang tinggi, walaupun 65 kDa lebih dominan dibandingkan 25 kDa. Pada protein dengan BM 87 kDa, dan 20 kDa tidak ditemukan adanya reaktivitas terhadap antibodi, yang berarti protein tersebut tidak mempunyai peranan penting dalam menginduksi *RAS* melalui jalur imun kompleks Ag-Ab komplemen.

Protein yang dominan pada kasus *RAS* minor melalui analisis *Westernblot* menunjukkan, bahwa reaktivitas protein 25 kDa dan 65 kDa terhadap antibodi poliklonal anti anomali protein

sangat jelas dan tinggi. Secara umum protein dengan BM 65 kDa tidak menunjukkan perbedaan dengan kasus *RAS* mayor. Tetapi sebagai pembeda kasus ini adalah protein dengan BM 30 kDa. Ditemukannya protein ini adalah merupakan penegasan dari fenomena yang timbul selama ini, bahwa *RAS* mayor merupakan lanjutan *RAS* minor. Tetapi dengan ditemukannya protein ini, *RAS* tipe mayor dan minor secara etiopatogenesis tidak ada hubungannya. Fenomena ini sesuai dengan data empiris di Bagian *Oral Medicine* FKG Unair.<sup>2</sup>

Hasil analisis protein pada *RAS* fase remisi dengan SDS-PAGE 12% ditemukan empat pita protein dengan BM 87 kDa, 65 kDa, 25 kDa, dan 20 kDa (Gambar 1). Jenis protein yang di ekspresikan pada *RAS* fase remisi tidak berbeda jauh dengan protein yang diekspresikan pada *RAS* minor, tetapi berbeda dengan *RAS* mayor yaitu ditemukan protein dengan BM 30 kDa. *RAS* minor dan remisi tidak ditemukan protein dengan BM 30 kDa, hal ini kemungkinan berkaitan dengan frekuensi stimulator pada proses translasi sel epitel dimana tidak terjadi induksi pada gen CDC 8 dan CDC 21.<sup>14</sup> Pada fase remisi protein 87 kDa di ekspresikan lebih stabil, sehingga dapat menginduksi antibodi dengan titer tinggi, terbukti pada analisis *Westernblot* yang mempunyai reaktivitas terhadap antibodi poliklonal anti anomali protein ditemukan pada protein dengan BM 87 kDa dan 65 kDa. Oleh karena itu kemungkinan fungsi dari protein 87 kDa adalah sebagai induktor terhadap proses penyembuhan *RAS* melalui pembentukan keratinisasi.<sup>16</sup>

Stabilnya ekspresi protein anomali 65 kDa ini menunjukkan adanya aktivitas enzim polimerase II atau protein kinase yang simultan yang berarti terdapat rangsangan terus menerus menginduksi faktor internal ataupun eksternal sehingga mengakibatkan protein anomali tersebut diekspresikan secara terus menerus yang berakibat *RAS* dapat terjadi berulang-ulang. Fenomena ini terbukti pada analisis densitometri (data tidak ditampilkan) menunjukkan bahwa protein 65 kDa mempunyai homogenitas yang tinggi begitu juga densitasnya, sehingga protein tersebut dapat menginduksi respons antibodi secara simultan.<sup>12</sup> Protein 65 kDa merupakan protein yang sangat penting dalam etiopatogenesis timbulnya *RAS*, maka protein 65 kDa selalu ditemukan pada semua kasus *RAS* (mayor, minor, remisi). Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa anomali protein dominan spesifik *RAS* yang diekspresikan pada penderita adalah protein dengan berat molekul (BM) 87, 65, 25, 20 kDa dan protein mukosa

spesifik RAS yang paling utama (predominan) adalah protein dengan BM 65 kDa.

### Daftar Acuan

1. Scully C. Aphthous Ulcers. *J Med* 2002; 6 (6): 1-19.
2. Soemarijah S. Respons Imun Humoral terhadap *Streptococcus sanguis* pada *Recurrent Aphthous Stomatitis* [Disertasi]. Surabaya: Pascasarjana Universitas Airlangga, 1985:1-35.
3. Ship JA. Recurrent Aphthous Stomatitis. An Update. *Oral Surg Oral Med* 2001;81 (2):141-7.
4. Pongissawaranun W, Laohapand P. Epidemiologic Study on Recurrent Aphthous Stomatitis in a Thai dental Patient's Population. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997;19:52.
5. Ernawati DS. *Anomaly Protein of Oral Mucosa Induces Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)*. International Congress 2<sup>nd</sup> Bali FDI-Indonesian Dental Association (IDA). Denpasar, Bali: PDGI, 2002.
6. Endah AP, Soewondo I K. *Prevalensi Kelainan Mukosa Mulut antara Pria dan Wanita di Klinik Ilmu Penyakit Mulut FKG Unair (Maret-Juli 1996)*. Kumpulan Naskah Timnas I. Peringatan 70 thn Pendidikan Dokter Gigi Indonesia, Surabaya. Surabaya: FKG Unair, 1998.
7. Guranska N and Urbaniak B. Recurrent Aphthous Ulcers. The Etiology with Special Reference to Immunological Theory. *J Pol Merkuriusz Lek* 2002;8(44):113-7.
8. Barrons R W. Treatment Strategies for Recurrent Aphthous Ulcers. *Am J Health Syst Pharm* 2001;58(1):41-50.
9. Scully C, Gorsky M, Lozada-Nur F. The Diagnosis and Management of Recurrent Aphthous Stomatitis: A Consensus Approach. *J Am Dent* 2003;134(2):200-7.
10. Sistig S, Vucicevic-Boras V, Lukae J, Kusic Z. Salivary IgA and IgG Subclasses in Oral Mucosal Disease. *J Oral Dis* 2002;8(6):282-6.
11. Mc Nally J. <http://aphthous.Stress.study.Tripod.com/result.doc>. Tanggal akses 18 Januari 2003.
12. Ernawati D. Analisis Densitometri Protein 65 kDa Mukosa Mulut pada RAS Mayor. *Indonesian Journal of Tropical Medicine* 2004;15 (1):58-64.
13. Rantam FA. *Metode Immunologi*. Surabaya: Airlangga University Press. 2003.
14. Knippers R. *Molekulare Genetik*. Georg. Rudigerstrabe: Thieme Verlag 1997;14.
15. Austyn J, Wood KJ. *Principles of Cellular and Molecular Immunology*. New York: Oxford University Press, 1994:113.
16. Soames JV, Southam. *Oral Pathology* 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: University Press. 1998:212-8.