

Perbedaan kadar *tumor necrosis factor-alpha* dalam darah vena pada pasien dengan periodontitis apikalis dan pulpa normal

Meiny Faudah Amin¹, Taufiq Ariwibowo¹, Mutiara Risa Anggriani^{1*}

¹Departemen Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti, Indonesia

*Korespondensi: tiaraltha10@gmail.com

Submisi: 18 Januari 2022; Penerimaan: 27 Desember 2022; Publikasi online: 29 Desember 2022

DOI: [10.24198/jkg.v34i3.37885](https://doi.org/10.24198/jkg.v34i3.37885)

ABSTRAK

Pendahuluan: Periodontitis Apikalis (PA) adalah peradangan jaringan periapikal yang berawal dari lesi karies. Tubuli dentin yang terbuka akibat adanya karies menjadi jalan masuk bakteri dan produknya. Proses ini akan terus berlanjut hingga mengakibatkan nekrosis pulpa dan peradangan berat sampai ke periapikal gigi. Infeksi pada gigi ini akan memediasi peradangan dan menginduksi sel untuk mengeluarkan sitokin proinflamasi. *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) merupakan salah satu sitokin pada respon inflamasi akut bakteri Gram negatif dan protein pada fase akut. Tujuan penelitian menganalisis perbedaan jumlah kadar TNF- α di dalam sirkulasi darah vena antara pasien dengan periodontitis apikalis dan pasien dengan pulpa normal. **Metode:** Penelitian ini merupakan observasional analitik dengan rancangan *cross sectional study*. Sampel diambil dari darah vena 10 orang pasien dengan periodontitis apikalis dan 10 pasien normal (tanpa adanya gigi yang terinfeksi PA). Sampel ditentukan berdasarkan hasil anamnesis, pemeriksaan klinis yang dilakukan seperti tes perkusi atau palpasi dan terdapatnya gambaran radiolusen di apikal gigi. Kadar TNF- α , diperiksa menggunakan metode *Sandwich ELISA*, kemudian data dianalisis menggunakan uji statistik T tidak berpasangan. **Hasil:** Kadar TNF- α pada sampel darah vena pasien dengan periodontitis apikalis berkisar antara 0,068-0,121 mg/L, sedangkan kadar TNF- α pada pasien dengan pulpa normal berkisar 0,061- 0,143 mg/L. Uji *T-test independent* menunjukkan nilai $p=0,389$ ($p<0,05$). **Simpulan:** Kadar TNF- α pada pasien dengan PA dan pulpa normal tidak memiliki perbedaan yang signifikan secara statistik.

Kata kunci: periodontitis apikalis; *porphyromonas endodontalis*; *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α); pulpa normal

The different of tumor necrosis factor-alpha level in venous blood in patient with apical periodontitis and normal pulp

ABSTRACT

Introduction: Apical periodontitis (AP) is an inflammation of periapical tissue initiated by caries lesions. The exposed dentin tubules due to caries are an entrance for bacteria and its products. This process will continue to result in pulp necrosis and severe inflammation extending to the periapical area of the tooth. The infection of this tooth will mediate inflammation and induce cells to release proinflammatory cytokines. *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) is one of the acute inflammatory response cytokines in Gram-negative bacteria and protein in the acute phase. The purpose of this study is to analyze different levels of TNF- α in venous blood circulation between patients with AP and normal pulp. **Methods:** The type of study was an observational analytic with cross sectional study design. The blood samples were collected from 10 patients with AP and 10 with normal pulp. Samples were determined from medical history, percussion and palpation clinical examination, and apical radiolucency. TNF- α levels were then examined using the *Sandwich ELISA* method, and data were analyzed using an unpaired T-test. **Results:** TNF- α levels in venous blood samples from patients with AP ranged from 0,068-0,121 mg/L, and TNF- α levels in patients with normal pulp were 0,061- 0,143 mg/L. Unpaired t-test showed no significant difference $p=0,389$ ($p<0,02$). **Conclusion:** TNF- α levels in patients with AP and normal pulp did not differ statistically.

Keywords: apical periodontitis; *porphyromonas endodontalis*; *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α); normal pulp

PENDAHULUAN

Karies gigi melibatkan interaksi antara struktur gigi, biofilm yang terbentuk pada permukaan gigi, gula, dan saliva.¹ Bakteri dalam mulut akan memfermentasi karbohidrat sehingga menghasilkan asam dan menyebabkan penurunan pH dalam mulut. Penurunan pH secara berulang akan mengakibatkan demineralisasi permukaan gigi.^{1,2} Dentin yang terbuka dalam rongga mulut akibat lesi karies dapat menjadi jalan masuk bagi bakteri melalui tubuli dentin. Bakteri akan menyerang tubuli koronal dentin kemudian dapat menyebabkan penyakit pulpa dan menyebabkan infeksi pada sistem saluran akar.

Jaringan pulpa selanjutnya akan mengalami peradangan yang disebut juga dengan pulpitis reversibel. Iritasi pada pulpa yang terus berlanjut dan menyebabkan peradangan berat dapat menyebabkan pulpitis ireversibel dan akhirnya menjadi nekrosis pulpa.⁴ Infeksi akan berlanjut ke arah apikal sampai produk dari bakteri atau bakteri itu sendiri mencapai jaringan periapikal. Proses tersebut menyebabkan saluran akar terinfeksi dan selanjutnya akan menjadi periodontitis apikalis (PA).⁵

Penelitian sebelumnya menunjukkan keberadaan *Porphyromonas endodontalis* pada periodontitis kronis disertai dengan lesi periapikal.⁶ Spesies ini ditemukan pada infeksi pulpa gigi dan terlibat sebagai salah satu penyebab infeksi saluran akar yang menyebabkan PA. *Porphyromonas endodontalis* memiliki lipopolisakarida (LPS) yang terbukti memainkan peran penting dalam memulai dan mengembangkan PA. Lipopolisakarida akan memediasi peradangan dan menginduksi sel untuk mengeluarkan sitokin proinflamasi.⁵ Periodontitis apikalis (PA) dibagi menjadi dua macam, yaitu periodontitis apikalis simptomatik dan asimptomatik. Periodontitis apikalis asimptomatik tidak memberikan gejala klinis, namun pada gambaran radiograf akan menunjukkan gambaran radiolusensi pada daerah apikal yang merupakan penghancuran jaringan periodonsium yang berasal dari pulpa.⁷

Proses resorpsi tulang di daerah periradikular dimodulasi oleh sitokin proinflamasi seperti interleukin (IL)-1 β , IL-6, interferon (IFN)- γ dan *tumor necrosis factor* (TNF- α), dan sitokin anti-inflamasi seperti *transforming growth factor*

(TGF)- β dan IL-4.⁸ TNF- α merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri Gram negatif dan mikroba lainnya. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF- α dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik.⁹ Berdasarkan beberapa penelitian, infeksi gigi seperti PA dapat mempotensiasi patogenesis penyakit autoimun dengan meningkatkan infiltrasi sel inflamasi dan kadar serum sitokin.¹⁰

Elsalhy *et al.*¹¹ pada penelitiannya membandingkan kadar sitokin pada gigi dengan pulpitis ireversibel dan gigi yang belum mengalami karies, didapatkan hasil bahwa kadar TNF- α lebih tinggi pada kelompok dengan pulpitis ireversibel. Tujuan penelitian menganalisis perbedaan kadar TNF- α dalam darah vena pasien dengan periodontitis apikalis dan pulpa normal.

METODE

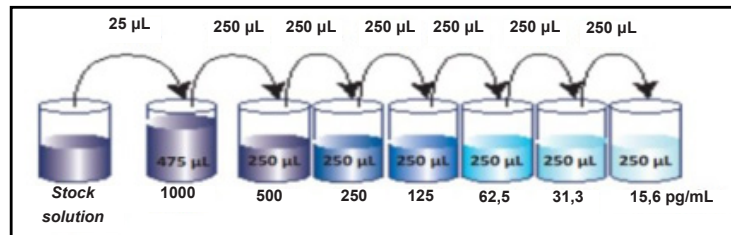
Jenis penelitian observasional analitik dengan menggunakan *cross sectional study*. Pengambilan sampel dan penelitian dilaksanakan di RSGMP Universitas Trisakti dan Laboratorium BioCore Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti. Sampel diambil dari darah vena 10 orang pasien dengan PA dan 10 pasien dengan pulpa normal. Sampel ditentukan berdasarkan hasil anamnesis, pemeriksaan klinis seperti adanya rasa sakit pada saat perkusi atau palpasi. Pemeriksaan penunjang radiografi juga dilakukan untuk melihat kelainan periapikal yaitu pelebaran pada ligamen periodontal dan terputusnya lamina dura.

Besar sampel diperoleh dari rumus *Hypothesis Testing for two sample means (two sided test)* yang memberikan hasil sebanyak 20 sampel. Bahan dan instrumen yang digunakan terdiri dari pipet, *microplate reader*, *deionized water*, pencuci *microplate* otomatis, kertas grafik log-log, tabung standar pengenceran, *plate shaker*, *timer*, *vials polypropylene*, kit ELISA merek 'Biolegend' dengan *lot number*: 13221830.

Sampel berupa darah vena diambil menggunakan tabung non EDTA dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 1,000x g kemudian sampel dipisahkan dan serumnya disimpan dengan suhu <-70⁰ C. Sampel yang berupa serum darah menggunakan metode ELISA *Sandwich*, dilakukan pengenceran 20 kali *wash buffer* menjadi 1 kali dengan *deionized*

water. Lyophilized human TNF- α standard diganti dengan ditambahkan volume dari Assay Buffer A yang diindikasikan pada label vial untuk membuat *standard stock solution* 20ng/mL. Sampel pada umumnya dianalisis tanpa pelarut, namun apabila pelarut dibutuhkan, maka dapat menggunakan *assay buffer A* sebagai pelarut. Prosedur assay dilakukan dengan menyiapkan 500 μ L dari 1000 pg/mL *top standard* dengan melarutkan 25 μ L

dari *standard stock solution* pada 475 μ L dari *assay buffer A*. Pelarutan dilakukan enam kali lipat dari 1000 pg/mL *top standard* pada tabung yang berbeda menggunakan *assay buffer A* sebagai pelarut. Konsentrasi human TNF- α didapatkan sebanyak 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,2 pg/mL, 31,3 pg/mL, dan 15,6 pg/mL. *Assay buffer A* berfungsi sebagai *zero standard* (0 pg/mL) (Gambar 1).



Gambar 1. Proses pengenceran *stock solution*.¹²

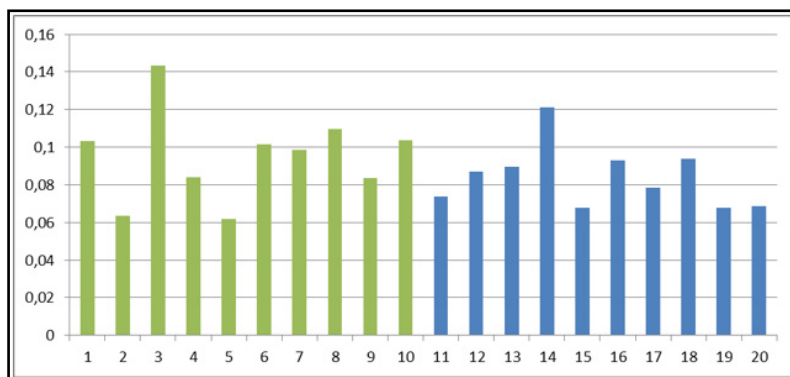
Plate dicuci sebanyak empat kali dengan sekurangnya 300 μ L dari 1 kali *wash buffer* untuk setiap *well*, sisa *buffer* dihilangkan dengan cara menekan *plate* pada bagian atas dan bawahnya menggunakan kertas pengering (*absorbent paper*). Kemudian, sebanyak 50 μ L ditambahkan dari *assay buffer A* untuk setiap *well* yang mengandung larutan standar ataupun sampel dan 50 μ L dari larutan standar atau sampel pada *well*. *Plate* ditutup menggunakan *plate sealer* dan diinkubasi dalam suhu ruangan serta digetarkan dengan kecepatan 200 rpm selama 2 jam. Isi *plate* dibuang lalu dicuci sebanyak 4 kali menggunakan 1 kali *wash buffer* dengan cara yang sama. Selanjutnya, 100 μ L ditambahkan dari human TNF- α *detection antibody solution* pada setiap *well*, *plate* ditutup, dan diinkubasi dalam temperatur ruangan dan digetarkan selama satu jam. Isi *plate* dibuang ke pembuangan lalu cuci *plate* sebanyak empat kali menggunakan 1 kali *wash buffer*. Sebanyak 100 μ L larutan Avidin-HRP B ditambahkan pada setiap *well*, *plate* ditutup, diinkubasi dalam suhu ruangan dan digetarkan selama 30 menit. Isi pada *plate* kemudian dibuang dan *plate* dicuci sebanyak 5 kali dengan 1 kali *wash buffer*, dimana pada tahap pencucian terakhir *well* direndam dalam 1 kali *wash buffer* selama 30 detik-1 menit pada setiap siklus pencucian. Sebanyak 100 μ L *substrate solution D* ditambahkan pada setiap *well* dan diinkubasi dalam waktu 15 menit pada keadaan gelap. *Well* yang mengandung human TNF- α akan menunjukkan perubahan warna menjadi biru

dimana dengan intensitas warna yang semakin pekat maka semakin tinggi konsentrasinya. Reaksi diberhentikan dengan ditambahkan 100 μ L larutan *stop solution* pada setiap *well* dan warna larutan akan berubah menjadi kuning. Tingkat penyerapan dihitung pada 450 nm setelah reaksi berhenti dalam waktu 30 menit. Uji normalitas menunjukkan sebaran data normal, selanjutnya digunakan uji parametrik yaitu uji T tidak berpasangan karena terdapat dua kelompok data. Uji parametrik menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara dua sampel. Penelitian dilakukan pada September-Februari 2019 dan sudah mendapatkan *ethical clearance* dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti dengan nomor persetujuan etik 217/SI/KEPK/FKG/10/2018.

HASIL

Hasil penelitian menunjukkan adanya kadar TNF- α pada semua sampel serum darah vena. Kadar TNF- α pada *plate* ditandai dengan perubahan warna menjadi biru setelah diberi *TMB reagent* dan berubah menjadi warna kuning setelah diberi *stop solution*. Warna kuning yang dihasilkan semakin pekat, maka semakin tinggi kadar absorbansi TNF- α dan kadar absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi antigen yang diperiksa.

Gambar 2. Kadar TNF- α dalam 20 sampel. sumbu x nomor 1–10 merupakan pasien dengan pulpa normal dan 11–20 pasien dengan PA. Sumbu y merupakan kadar TNF- α dalam pg/mL



Gambar 2. Kadar TNF- α dalam 20 sampel. sumbu x nomor 1–10 merupakan pasien dengan jaringan pulpa normal dan 11–20 pasien dengan PA. Sumbu y merupakan kadar TNF- α dalam pg/mL

Gambar 2 menunjukkan grafik kadar TNF- α , dimana nomor sampel 1-10 merupakan kelompok pulpa normal, dan nomer 11-20 merupakan kelompok dengan PA. Grafik tidak menunjukkan bahwa kadar TNF- α lebih tinggi pada gigi dengan PA dibandingkan pulpa normal. TNF- α pada kelompok dengan PA terdeteksi dengan kadar yang berkisar antara 0,068-0,121 mg/L, dan kadar TNF- α pada pulpa normal terdeteksi dengan kadar yang berkisar 0,061- 0,143 mg/L.

Tabel 1 . Hasil analisis Uji T-test independent

Independent samples test			
TNF-A	n	F	Nilai-p
Subjek dengan PA	10	0,778	0,389
Subjek tanpa PA	10		

Uji normalitas Shapiro-Wilk menggunakan aplikasi IBM SPSS *Statistics* 22 mendapatkan hasil yaitu 0,425 dan 0,105. Data tersebut lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan data berdistribusi normal. Berdasarkan tabel 1, uji T-test menunjukkan hasil $p=0,389$ yang lebih besar dari 0,05 (tidak bermakna). Uji T-test tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kadar TNF- α pada darah vena dengan PA dan pulpa normal secara statistik. Uji T Test *Independent* menunjukan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara subjek dengan PA dan pulpa normal ($p>0,05$).

PEMBAHASAN

Kadar TNF- α yang diperiksa menggunakan metode ELISA *Sandwich* menunjukan kadar TNF- α pada gigi dengan PA tidak memiliki perbedaan kadar dengan pulpa normal (gambar 2). Uji T-test *independent* antara kelompok dengan PA dan pulpa

normal (tabel 1) tidak menunjukkan perbedaan kadar yang signifikan secara statistik. Hal ini tidak sejalan dengan penelitian Amin dkk¹³ yang memiliki hasil bahwa terdapat peningkatan serum sitokin inflamatori yang diantaranya adalah TNF- α , yang diteliti pada darah soket paska pencabutan pada subjek dengan PA. hal ini dapat terjadi karena P. endodontalis dalam darah periapikal dalam kasus AP akan melepaskan LPS, yang merangsang makrofag, dan limfosit T mengeluarkan beberapa penanda inflamasi kronis seperti TNF- α , IL-1 β ,dan IL-17. Cintra dkk¹⁰ tahun 2016 juga meneliti apakah PA pada satu gigi atau lebih dapat mengubah kadar serum IL-6, IL-17, IL-23, dan TNF- α pada tikus dengan PA. Hasil membuktikan bahwa terdapat peningkatan kadar sitokin proinflamasi pada tikus dengan PA pada beberapa gigi.

Gambar 2 memperlihatkan kadar TNF- α juga terdeteksi pada pasien dengan pulpa normal, namun memiliki sedikit perbedaan kadar dibandingkan dengan pasien dengan PA, sehingga dari hasil penelitian tersebut tidak mencapai signifikansi statistik. Jakovljevic *et al.*¹⁴ yang meneliti mengenai kadar sitokin proinflamasi pada subjek dengan PA mendapatkan hasil bahwa TNF- α memiliki konsentrasi rata-rata yang paling kecil apabila dibandingkan dengan IL-1 β dan IL-6. TNF- α hanya terdeteksi pada 23 dari 100 subjek dengan PA.

Mediator peradangan seperti sitokin, kemokin, dan protein fase akut dapat dideteksi pada individu yang sehat maupun memiliki penyakit. Penting untuk diketahui bahwa kadar sitokin sering kali berada pada level yang rendah pada pasien sehat.^{9,15} Hal ini dikarenakan tidak adanya peradangan/inflamasi pada pasien tersebut sehingga tidak ada sitokin yang diproduksi secara

berlebih.¹⁶

Kehadiran dari mediator inflamasi yang terus menerus pada individu yang tampaknya sehat disebut juga dengan peradangan sistemik atau peradangan tingkat rendah.¹⁵ Sampel darah vena pada kelompok pulpa normal nomor 3 (gambar 2) memiliki jumlah kadar yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan sampel darah vena pada kelompok periodontitis apikalis. Berdasarkan keadaan tersebut pasien pada pulpa normal juga dapat memiliki kadar TNF- α yang tinggi dalam darah. Beberapa hal yang dapat mempengaruhi kadar TNF- α adalah obesitas, diabetes mellitus tipe 2, serta *polycystic ovary syndrome* (PCOS)^{16,17,18}.

Hasil uji ELISA pada penelitian ini tidak sejalan dengan penelitian-penelitian sebelumnya dapat disebabkan oleh banyak faktor, diantaranya keadaan sampel, *reagen*, dan kesalahan operator pada saat pengerjaan atau *human error*. Pemilihan subjek yang kurang tepat juga dapat mempengaruhi kondisi dari sampel. Anamnesis dan pemeriksaan klinis yang teliti sangat diperlukan dalam pemilihan subjek untuk mengetahui riwayat subjek dan menghindari kesalahan dalam diagnosis. Anamnesis dan pemeriksaan klinis yang kurang pada saat pengambilan sampel, dapat menyebabkan kurangnya informasi mengenai keadaan pasien. Peradangan seperti alergi atau pasien tidak mengetahui bahwa memiliki kelainan sistemik pada saat pengambilan sampel dapat menyebabkan sampel menjadi bias dan hasil menjadi tidak akurat.¹⁹

Pemilihan subjek dalam penelitian harus disesuaikan dengan kriteria eksklusi dan inklusi yang sudah ditetapkan yaitu, memiliki lesi periapikal, tidak memiliki penyakit sistemik, dan tidak sedang mengonsumsi obat-obatan selama 4 minggu terakhir. Faktor lain yang dapat mempengaruhi adalah kualitas dari sampel dan *reagen* yang akan digunakan. Sampel harus disimpan didalam lemari pendingin dengan suhu -80⁰ sebelum digunakan.²⁰ *Reagen* yang digunakan juga harus disimpan didalam lemari pendingin saat sedang tidak digunakan, dan baik digunakan sebelum tanggal kadaluarsa untuk hasil yang maksimal. Perbedaan perlakuan atau *human error* diperkirakan adalah hal terakhir yang dapat mempengaruhi hasil dari uji ELISA dalam penelitian ini. Perbedaan dalam perlakuan atau *human error* pada penelitian ini akan mempengaruhi hipotesis

dan juga hasil dari penelitian sehingga dibutuhkan ketelitian dan ketepatan pada saat melakukan penelitian.

SIMPULAN

Kadar TNF- α pada 10 sampel darah vena pasien dengan PA dan 10 sampel darah vena pasien dengan pulpa normal tidak memiliki perbedaan kadar yang bermakna berdasarkan hasil uji ELISA.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pitts N, Domenick TZ, Phill DM, Ekstrand K. Dental caries. *Nature reviews*. 2017;3(1):1-16. DOI: [10.1038/nrdp.2017.30](https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30)
2. Kidd E, Fejerskov. *Essentials of Dental Caries*. 4th ed. New York. USA: Oxford University Press; 2016. p. 374.
3. Fouad A. *Endodontic Microbiology* 2nd ed. Chapel Hill: John Wiley & Sons, Inc; 2017. p. 26.
4. Torabinejad M, Walton RE, Fouad A. *Endodontic Principles and Practice*. Missouri: Elsevier. 2015. p. 54
5. Gomez BPFDA, Herrera DR. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Braz oral res*. 2018 Oct 18;32(suppl 1):e69. DOI: [10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0069](https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0069)
6. Bedran TBL, Marcantiono RAC, Neto LC, Mayer MPA, Grenier D, Spolidorio LC, Spolidorio DP. *Porphyromonas endodontalis* in chronic periodontitis: a clinical and microbiological cross-sectional study. *J Oral Microbiol*. 2012;4:10123 DOI: [10.3402/jom.v4i0.10123](https://doi.org/10.3402/jom.v4i0.10123)
7. Hargreaves K, Berman L. *Cohen's Pathways of the Pulp*. 11th ed. Missouri: Mosby Elsevier; 2016. p. 29-30.
8. Ariwibowo T, Amin MF, Baiti RN. Perbedaan kadar interleukin-6 dalam darah vena antara pasien dengan dan tanpa periodontitis apikalis. *J Ked Gi Unpad*. 2021;33(3):174-9. DOI: [10.24198/jkg.v33i3.34020](https://doi.org/10.24198/jkg.v33i3.34020)
9. Supit IA, Pangemanan DHC, Marunduh SR. Profil tumor necrosis factor alpha (TNF- α) berdasarkan indeks massa tubuh (IMT) pada mahasiswa fakultas kedokteran UNSRAT Angkatan 2014. *J e-Biomedik*

- (eBm). 2015;3(1);640-3. DOI: [10.35790/ebm.v3i2.8621](https://doi.org/10.35790/ebm.v3i2.8621)
10. Cintra LTA, Samuel RO, Azuma MM, de Queiróz AOS, Ervolino E, Sumida DH, et al. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. *J Endod*. 2016;42(5);747-51 DOI: [10.1016/j.joen.2016.01.022](https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.01.022)
 11. Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Internat Endod J*. 2013;46(6):573-80. DOI: [10.1111/iej.12030](https://doi.org/10.1111/iej.12030)
 12. Technical Data Sheet ELISA MAX Standard Set Human TNF- α . 2022. Available from: <https://www.biolegend.com/nl-be/products/human-tnf-alpha-elisa-max-standard-2228>
 13. Amin MF, Meidyawati R, Djamil MS, Latief BS. Inflammatory cytokine serum levels in sockets following extraction of teeth with apical periodontitis. *J Inter Dent Medic Res*. 2019;12(1):129-32.
 14. Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, Soldatovic I, Popovic B, Milasin J, Andric M.. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. *Australian Endod J*. 2015;41(2):72-7. DOI: [10.1111/aej.12072](https://doi.org/10.1111/aej.12072)
 15. Georgiou AC, Crielaard W, Ourwerling P, McLean W, Lappin DF, Waal SVVD. The influence of apical periodontitis on the concentration of inflammatory mediators in peripheral blood plasma and the metagenomic profiling of endodontic infections: Study design and protocol. *Contemp Clin Trials Commun* . 2020 Dec 5;21:100686. DOI: [10.1016%2Fj.conctc.2020.100686](https://doi.org/10.1016%2Fj.conctc.2020.100686)
 16. Susantiningsih T, Mustofa S. Ekpresi IL-6 dan TNF- α pada obesitas. *JK Unila*. 2018; 2(2):174-80. DOI: [10.23960/jkunila22174-180](https://doi.org/10.23960/jkunila22174-180)
 17. Alzamil H. Elevated serum TNF- is related to obesity in type 2 mellitus and is associated with glycemic control and resistance. *J Obesity*. 2020;1-5 DOI: [10.1155%2F2020%2F5076858](https://doi.org/10.1155%2F2020%2F5076858)
 18. Gao L, Gu Y, Yin X. High serum tumor necrosis factor-alpha levels in women with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *PLOS ONE*. 2016;11(10):1-18. DOI: [10.1371/journal.pone.0164021](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164021)
 19. Simundic AM. Bias On Research. *Biochemia Medica*. 2013;23(1):12-5 DOI: [10.11613%2FBM.2013.003](https://doi.org/10.11613%2FBM.2013.003)
 20. Dou Y, Lv Y, Zhou X, He L, Liu H, Li P, et al. Antybody-sandwich ELISA analysis of a novel blood biomarker of CST4 gastrointestinal cancers. *Beijing: Onco Targets and Therapy*; 2018;11:1743-1756. DOI: [10.2147/ott.s149204](https://doi.org/10.2147/ott.s149204)