

(Penelitian)

Perbedaan Jumlah *Porphyromonas endodontalis* pada Diagnosis Pulpitis Ireversibel dan Nekrosis Pulpa

¹ Taufiq Ariwibowo ² Bryan Wangidjaja ³ Meiny Faudah Amin

¹ Staff Pengajar Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti

² Mahasiswa Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti

³ Staff Pengajar Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti

ABSTRACT

Background: Pulp diseases can be affected by bacterial invasion such as *Porphyromonas endodontalis*. This bacterial invasion can lead to pulp diseases which include irreversible pulpitis and necrotic pulp. **Purpose:** To determine *Porphyromonas endodontalis* difference between teeth with irreversible pulpitis and necrotic pulp. **Method:** Samples were taken from root canals fluid of 18 teeth, 9 teeth with irreversible pulpitis, 9 teeth with necrotic pulp, using paper point. The paper point was placed in sterile Eppendorf tube, then DNA were extracted using Heat-Shock DNA Extraction method. Real-time PCR was used to collect the data. The conversion of microbiological data were used standard curve of *Porphyromonas endodontalis*. **Result:** The average of Real-time PCR on irreversible pulpitis was 6.9×10^{-12} ng/mL and on necrotic pulp was 1.3×10^{-12} ng/mL. However, t independent test showed there was no significant difference of *Porphyromonas endodontalis* between teeth with irreversible pulpitis and necrotic pulp ($p>0,05$). **Conclusion:** There was no difference in the total number of *Porphyromonas endodontalis* between teeth with irreversible pulpitis and necrotic pulp.

Keywords: *Porphyromonas endodontalis*, root canal, irreversible pulpitis, necrotic pulp.

LATAR BELAKANG

Pulpa merupakan bagian gigi yang terbentuk oleh jaringan ikat dan terbentuk menyerupai ruangan yang diselimuti oleh jaringan dentin yang keras. Jaringan pulpa memiliki beberapa fungsi penting, salah satunya adalah fungsi formatif. Fungsi formatif merupakan fungsi utama yang membutuhkan peran osteoblas dalam membentuk dentin tersier sebagai tanggapan terhadap beberapa rangsangan iritan mikroba, iritan mekanik, maupun iritan kimia.¹

Penyakit pulpa di Indonesia tahun 2010 menduduki urutan ke tujuh dari sepuluh penyakit terbanyak pada pasien rawat jalan rumah sakit di Indonesia dengan jumlah sebanyak 163.211 pasien.² Kota Makassar terhitung pada tahun 2015 dari sepuluh penyakit utama, penyakit pulpa memasuki urutan keenam untuk semua golongan umur dengan jumlah sebanyak 34.729 orang.³ Kedua data tersebut menyatakan bahwa kasus penyakit pulpa merupakan kasus utama dan terbanyak pada gigi dan mulut yang diderita oleh masyarakat indonesia.^{2,3}

Penyakit pulpa disebabkan oleh adanya invasi bakteri pada jaringan pulpa karena karies.⁴ Berdasarkan teminologi dan diagnosisnya penyakit pulpa dibagi menjadi beberapa diagnosis. Diagnosis pulpa tersebut diklasifikasikan sebagai pulpa normal, pulpitis reversibel, pulpitis ireversibel, atau nekrosis pulpa.⁵

Pulpitis ireversibel merupakan diagnosis jaringan pulpa yang terinfiamasi namun tetap vital pada saat

invasi bakteri di dalam pulpa, tetapi dalam beberapa waktu invasi bakteri akan cepat berubah menjadi nekrosis pulpa. Bakteri dapat pula menginfeksi pulpa nekrotik untuk berproduksi dan menginfeksi saluran akar.¹ Bakteri yang menjadi penyebab utama penyakit pulpa, khususnya pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa, umumnya adalah bakteri *Streptococcus mutans* dan *Lactobacillus spp.* Iritan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Lactobacillus spp.* tersebut tidak begitu berperan aktif dalam perkembangan pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa. Hal tersebut dikarenakan banyaknya spesies-spesies bakteri yang menginviasi dan berkoloni di jaringan pulpa. Jaringan pulpa juga memiliki sifat selektif dalam menentukan bakteri yang mendominasi jaringan pulpa.⁶

Pengetahuan tentang bakteri penting agar patogenesis penyakit pulpa dapat lebih dipahami. Semakin banyak jumlah bakteri pada jaringan pulpa semakin cepat pulpa terinfeksi, yang pada akhirnya mengakibatkan pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa. Bakteri *Porphyromonas endodontalis* diketahui merupakan bakteri Gram negatif anaerob yang dapat mempengaruhi terjadinya pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa. Gram negatif diketahui mengandung LPS (*Lipopolysacharide*) yang memiliki potensi dalam menyebab peradangan pada saluran akar. Pengetahuan menyeluruh dari proses iritan bakteri dan kandungan iritan bakteri pada penyakit pulpa yang merupakan dasar dari keberhasilan perawatan saluran akar.⁷

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ada perbedaan diagnosis pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa terhadap jumlah *Porphyromonas endodontalis*. Manfaat penelitian ini adalah (1) menambah ilmu kedokteran gigi mengenai jumlah *Porphyromonas endodontalis* pada saluran akar, (2) Menambah wawasan dan dapat berguna sebagai sosialisasi *Porphyromonas endodontalis* yang terdapat pada saluran akar gigi, dan (3) dapat digunakan sebagai ilmu pengetahuan salah satu penyebab infeksi pada gigi dikarenakan bakteri.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik. Pengambilan sampel penelitian dan penelitian ini dilaksanakan di RSGM-P Universitas Trisakti dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti pada bulan September-Desember 2018. Sampel penelitian ini adalah gigi pada diagnosis pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa. Besar sampel diperoleh dari rumus analitik numerik tidak berpasangan, yaitu sebanyak 18 sampel. Bahan dan instrumen penelitian terdiri dari sampel Paper point steril, *K-File*, Reamer, Tabung *eppendorf* 1.5-2 ml, *Phosphate Buffer saline* (PBS), Sarung tangan, Masker, *Cotton roll*, Pinset, *Microtube*, *Microcentrifuge*, Vortex, Waterbath, Ice Maker, Freezer, SYBR® Syber Green Reagent 10µL, Primer forward *Porphyromonas* dan reverse *Porphyromonas endodontalis*, PCR plate, DNA Tamplat Bakteri, Nuclease-free water to.

Penelitian diawali dengan pengambilan sampel *paper point steril* dan *K-file* sebanyak jumlah sampel yang diperlukan. Prosedur diteruskan dengan memeriksa status klinis dan foto radiografis pasien untuk menegakkan diagnosis yang diinginkan. Pasien diminta untuk membaca dan menyetujui *Informed consent*. Dokter gigi melakukan prosedur persiapan kerja dengan mengeringkan, mengisolasi area kerja menggunakan *cotton roll* agar menurunkan tingkat kontaminasi saliva saat pengambilan sampel, setelah itu sampel diambil dengan bahan *paper point steril* (didiamkan selama satu sampai 2 menit) dan *K-file* (gerakan menggesek secara rotasi). Setiap sampel disimpan pada tabung *eppendorf* 1.5-2 ml berisi satu mililiter *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Langkah diulangi sesuai jumlah sampel. Sampel dipisahkan menjadi dua bagian agar menjadi cadangan menghindari kejadian yang tidak diinginkan. Sebanyak 0,5 ml sampel bakteri di *vortex* dan di *sentrifugasi* pada 10,000 x g selama 10 menit. Sampel diresuspensi dengan 100 µL ddH₂O ditambah Bead dan Vortex 5 menit, kemudian dipanaskan dengan *waterbath* 100°C selama 20 menit untuk selanjutnya langsung diinkubasi di dalam es selama 10 menit (*vortex*). *Sentrifugasi* kembali dilakukan pada kecepatan

10,000 x g selama 2 menit. Sampel yang berisi supernatan DNA dipindahkan ke tabung baru, lalu disimpan di *freezer* suhu -20°C.

Tabel 1. Komponen campuran reaksi untuk uji RT-PCR.^{8,9}

Komponen	Volume	Konsentrasi
SYBR® Syber Green Reagent	10 µL	1X
Primer forward, 0,8µL	0,25µL-2,5µL	0,1µL-1,0µL
Primer reverse, 0,8µL	0,25µL-2,5µL	0,1µL-1,0µL
DNA templat	1-5µL	< 250 mg
Nuclease-free water to	20µL	-

Tabung ditutup dan diinversikan lembut, lalu dilakukan *sentrifugasi* untuk menurunkan isi dan menghilangkan gelembung. Prosedur dilanjutkan dengan memasukkan volume *MicroAmp™ Optical 48-Well Reaction Plate* 48 sebanyak 20 µL ke masing-masing reaksi. Pelat disegel dengan penutup perekat, kemudian dilanjutkan *sentrifugasi* pelat untuk menurunkan isi dan menghilangkan gelembung udara. Pelat reaksi dijalankan dalam waktu 2 jam setelah menyelesaikan pengaturan reaksi. Jika tidak dapat melakukannya, pelat disimpan pada suhu 4°C. *Running RT-PCR (StepOne Plus)* dilakukan dengan mengatur kondisi suhu yang akan digunakan (Tabel 2). Volume *MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate* diatur sebesar 20µL.⁸

Tabel 2. Kondisi suhu yang diaplikasikan pada RT-PCR.^{8,9}

Alat	Langkah	Suhu (°C)	Durasi
<i>Step One Plus</i>	AmpliTaq® Fast DNA Polymerase, UP Activation	95	20 detik
	Denaturasi	94	15 detik
	Annealing (penempelan primer)	60	15 detik

Analisis data yang digunakan adalah uji T tidak berpasangan. Setelah data diperoleh maka dilakukan pengolahan data dengan menggunakan program SPSS Version 1.0.0.1058.

HASIL PENELITIAN

DNA *Porphyromonas endodontalis* dari jaringan pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa diteliti dengan menggunakan *Real-time PCR*. Hasil tersebut dikonversikan dalam satuan ng/mL, menggunakan kurva standar. Hasil dari 18 sampel menunjukkan adanya *Porphyromonas endodontalis*. Gigi dengan diagnosis pulpitis ireversibel dan nekrosis tidak pulpa menunjukkan perbedaan jumlah *Porphyromonas endodontalis*.

Uji normalitas yang digunakan dalam penelitian ini adalah Shapiro-wilk. Berdasarkan hasil uji normalitas, kekerasan email gigi sebelum dan sesudah dilakukan perendaman adalah normal ($p>0,05$), sehingga dapat dilanjutkan dengan uji T tidak berpasangan.

Table 3. Hasil Penelitian P. Endodontalis Diagnosis pulpitis ireversible

Subjek penelitian	ng/mL
Pulpitis Ireversibel	
1	1.61×10^{-12}
2	1.54×10^{-14}
3	5.94×10^{-11}
4	7.57×10^{-14}
5	1.35×10^{-14}
6	2.64×10^{-13}
7	1.32×10^{-13}
8	5.28×10^{-15}
9	5.98×10^{-13}

Hasil tertinggi sampel pulpitis ireversibel ada pada subjek nomor 3.

Table 4. Hasil Penelitian P. endodontalis diagnosis nekrosis pulpa

Subjek penelitian	ng/mL
Nekrosis Pulpa	
1	2.32×10^{-13}
2	2.69×10^{-13}
3	1.62×10^{-12}
4	2.61×10^{-12}
5	6.73×10^{-12}
6	7.66×10^{-14}
7	5.85×10^{-14}
8	2.42×10^{-14}
9	3.10×10^{-13}

Hasil tertinggi sampel pulpitis ireversibel ada pada subjek nomor 5.

Table5. Uji Normalitas *Porphyromonas endodontalis*

	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	.128	18	.200	.973	18	.859

Uji normalitas dengan jumlah sampel dibawah 50 sampel menggunakan perhitungan *Shapiro-Wilk* (*sig./P>0.05*) menunjukkan hasil yang bermakna.

Uji normalitas menunjukkan nilai *sig* atau *p>0,05*, akan dilakukan uji T tidak berpasangan. Peneliti memilih uji T tidak berpasangan dengan alasan subjek gigi pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa ialah subjek yang berbeda. Hasil uji menunjukkan nilai *p>0,05* maka *H0* diterima berarti tidak terdapat perbedaan signifikan antara kedua kelompok diagnosis yang dibandingkan. Penelitian ini memiliki nilai *p* adalah 0,575 (*p>0,05*), hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada subjek gigi pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa.

Table 6. Uji T Tidak Berpasangan *Porphyromonas endodontalis*

<i>Porphyromonas endodontalis</i>	n	Rerata ± s.b.	P
Pulpitis ireversibel	9	$-12,75 \pm 1,25$	0,575
Nekrosis pulpa	9	$-12,46 \pm 0,81$	

Nilai *P* (0,575) memiliki arti lebih besar dari 0,05 yang menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan jumlah *P. endodontalis* pada diagnosis pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa.

PEMBAHASAN

Pemahaman mengenai perbedaan diagnosis pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa terhadap jumlah *Porphyromonas endodontalis* dibidang kedokteran gigi masih terbatas. Jumlah *Porphyromonas endodontalis* tidak sebanyak bakteri-bakteri gram negatif lainnya namun bakteri ini berpigmen hitam serta memiliki lipopolisakarida (LPS) pada dinding selnya, yang telah diketahui bahwa LPS dapat mengakibat penyakit sistemik.^{10,11}

Pengambilan sampel 18 sampel gigi dilakukan pada bulan Oktober – November 2018 di RSGM-P Universitas Trisakti yang telah terbagi atas dua kelompok 9 gigi pulpitis ireversibel dan 9 gigi nekrosis pulpa. Penelitian dilakukan di Laboratorium MiCORE Universitas Trisakti pada bulan Desember 2018. Sampel yang didapat dilakukan ekstraksi DNA dengan cara *Heat-Shock*. Dua puluh sampel yang sudah menjadi DNA dikuantifikasi dengan *Real-time PCR*.⁸ *Real-time PCR* digunakan dalam penelitian ini karena jenis *PCR* ini dapat menghitung jumlah amplifikasi DNA.¹² Penelitian dimulai dengan melakukan ekstraksi DNA sampel *paper point* saluran akar gigi, kemudian mempersiapkan *master mix* dengan mencampurkan *SYBR green*, Primer forward (5'-GCT-GCA-GCT-CAA-CTG-TAG-TCT-TG-3') dan Primer reverse *Porphyromonas endodontalis* (5'-TCA-GTG-TCA-GAC-GGA-GCC-TAG-TAC-3'), NFW dan sampel DNA. *Reagent* yang akan digunakan dalam *Real-time PCR* ini adalah *SYBR green*, merupakan suatu zat yang memberi warna pada DNA sehingga dapat dideteksi, mengukur, dan memperlihatkan jumlah DNA yang telah diamplifikasi.^{8,13,14}

Telah diketahui bakteri tumbuh dalam bentuk biofilm pada dinding saluran akar yang terbentuk selama berminggu-minggu, berbulan-bulan, atau bertahun-tahun tergantung usia infeksi. Pengambilan sampel menggunakan *paper point*

yang ditempatkan di saluran akar yang belum diterinstrumentasi kebanyakan menangkap bakteri planktonik. Bahkan jika *k-file* digunakan untuk mengganggu biofilm yang ada di dinding saluran akar, diketahui hanya menyentuh sebagian dinding saluran. Isthmi, kanal lateral, dan tubulus dentin jarang dapat dicapai dengan alat sampel. Oleh karena itu, pengambilan sampel cenderung menunjukkan proporsi kecil dari kehadiran bakteri saluran akar, dan diperlukan metode pencitraan bakteri secara *in situ* untuk mendeskripsikan bakteri secara akurat.¹⁵

Beberapa studi penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa nekrosis pulpa telah terbukti menjadi tempat pertumbuhan awal *Porphyromonas endodontalis* sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan limfatisik dan matinya saraf dalam pulpa.¹¹ Pernyataan ini telah terbukti dalam beberapa penelitian yang menyatakan bahwa bakteri Gram negatif paling banyak ditemukan pada diagnosis nekrosis pulpa adalah *Porphyromonas spp* yang menginfeksi jaringan periapikal.¹⁶ Hasil tersebut didapat dikarenakan adanya perbedaan proses dan waktu dalam terjadinya pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa, terutama pada diagnosis nekrosis pulpa yang memiliki proses satu tingkat diatas pulpitis ireversibel yang mungkin mengakibatkan nilai *Porphyromonas endodontalis* lebih tinggi.

Hasil uji statistik juga menunjukkan $p>0,05$ yang berarti tidak adanya perbedaan jumlah koloni *Porphyromonas endodontalis* pada sampel gigi pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa. Penelitian ini menunjukkan hasil yang tidak sesuai dari penelitian penelitian pendahulu, terutama pada sampel gigi nekrosis pulpa.¹¹ Hasil tersebut terjadi dimungkinkan karena subjek yang berbeda, *oral hygiene* subjek yang buruk dan faktor teknis seperti proses pengambilan, waktu penyimpanan, dan paparan udara yang mempengaruhi hasil DNA bakteri tersebut.

Pembuktian untuk diagnosis pulpitis ireversibel dapat dilihat pada penelitian Martin dkk yang menyatakan bahwa adanya *Porphyromonas endodontalis* pada diagnosis pulpitis kronis.⁹ Pembuktian dari penelitian Gomes dkk, Penelitian ini membuktikan bahwa *Porphyromonas endodontalis* ada pada diagnosis nekrosis pulpa.¹⁷ Berdasarkan penelitian-penelitian pendahulu diatas menunjukkan bahwa *Porphyromonas endodontalis* tidak hanya berperan pada diagnosis tertentu, melainkan bakteri tersebut sudah menginviasi pulpa

sejak pulpitis ireversibel hingga terjadinya nekrosis pulpa.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian tidak terdapat perbedaan jumlah *Porphyromonas endodontalis* pada gigi pulpitis ireversibel dan nekrosis pulpa. Perlu penelitian lebih lanjut dengan lebih memperhatikan cara pemilihan bahan dan pengambilan sampel, serta status klinis pasien lebih baik sehingga dapat lebih mempresentasikan hasil lebih yang lebih baik.

PENGAKUAN

Penelitian telah didukung oleh Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Trisakti

KONFLIK KEPENTINGAN

Konflik kepentingan : Tidak ada

DAFTAR PUSTAKA

1. Torabinejad M, Walton RE. Principles and practice of endodontics. 4th Ed. St Louis (MO): Saunders; 2009. p. 1-56.
2. Kementerian Kesehatan Indonesia. Profil kesehatan Indonesia tahun 2010. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2011. p. 42.
3. Dinas Kesehatan kota Makassar. Profil kesehatan kota Makassar tahun 2015. Makassar: Pemerintahan Kota Makassar; 2016. p. 40.
4. Zero DT, Zandona AF, Vail MM, Spolnik KJ. Dental caries and pulpa disease. Dent Clin North Am. 2011;55(1): 29-46. DOI: 10.1016/j.cden.2010.08.010.
5. Berman LH, Hartwell CG. Diagnosis. In: Cohen S, Hargreaves KM, editor. Pathways of the pulp. 10th Ed. St Louis (MO): Mosby-Elsevier; 2011. p. 2-39.
6. Yamin IF, Natsir N. Dominant bacteria in root canal of necrotic teeth. J Dentomaxillofac Sci. 2014;13(2):113-6. DOI:10.15562/jdmfs.v13i2.399
7. Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC. Ingle's endodontics 6. Maidenhead: BC Deaker; 2008. p. 234-245.
8. Bedran TBL, Marcantonio RAC, Neto RS, Mayer MPA, Grenier D, Spolidorio LC, et al. *Porphyromonas endodontalis* in chronic periodontitis: A clinical and microbiological cross-sectional study. J Oral Microbiol. 2012;4(1):1-7. DOI: 10.3402/jom.v4i0.10123.
9. Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: Association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. J Clin Microbiol. 2002;40(5): 1698-704. DOI: 10.1128/JCM.40.5.1698-1704.2002
10. Baumgarter J. Mikrobiologi endodontia. In: Walton RE, Torabinejad M, editor. *Prinsip & praktik ilmu endodontia*. 3rd ed. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2008. p. 316-26.
11. Yustina AR, Suardita K, Agustin D. Peningkatan Jumlah Osteoklas pada Keradangan Periapikal Akibat Induksi Lipopolisakarida *Porphyromonas Gingivalis*. JBP [Internet]. 2012. 14(3): p. 140-4.

- Available from:
<http://journal.unair.ac.id/filerPDF/Biosains%20Vol%2014%20No%203%20September%202012-3.pdf>
12. Kuang J, Yan X, Genders AJ, Granata C, Bishop DJ. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS ONE.* 2018;13(5): 1–27. DOI: 10.1371/journal.pone.0196438.
 13. Applied Biosystems. Fast SYBR® Green Master Mix Protocol [Internet]. California: Lincon Center Drive; 2007[cited 2010 Jul]. p. 2-7. Available from: https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/cms_046776.pdf
 14. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* 2003;3(18);1–13. DOI: 10.1186/1472-6750-3-18
 15. Fouad AF. Endodontic Microbiology and Pathobiology: Current State of Knowledge. *Dent Clin North Am.* 2017;61(1);1–15. doi: 10.1016/j.cden.2016.08.001
 16. van Winkelhoff AJ, Martijn van Steenbergen TJ, de Graaff J. *Porphyromonas (bacteroides) endodontalis:* Its role in endodontal infections. *J Endod.* 1992;18(9); 431-4. DOI: 10.1016/s0099-2399(06)80843-5
 17. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. *Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens in endodontic lesions detected by culture and by PCR.* *Oral Microbiol Immunol.* 2005;20(4);211–5. DOI: 10.1111/j.1399-302X.2005.00214.x