

DISERTASI

**ANALISIS RASIO OSTEOLAS DAN OSTEOKLAS
PADA RESORPSI TULANG PERIPIKAL TIKUS WISTAR
BERDASARKAN KONSENTRASI DAN LAMA INDUKSI
BAKTERI *Fusobacterium nucleatum***

**OSTEOBLAST and OSTEOCLAST RATIO ANALYSIS in WISTAR RATS
PERIAPICAL BONE RESORPTION BASED on CONCENTRATION and
INDUCTION TIME that INDUCED by *Fusobacterium nucleatum***



JUNI JEKTI NUGROHO

P0200309048

PROGRAM S3 KEDOKTERAN PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2015

**ANALISIS RASIO OSTEOLAS DAN OSTEOKLAS
PADA RESORPSI TULANG PERIAPIKAL TIKUS WISTAR
BERDASARKAN KONSENTRASI DAN LAMA INDUKSI
BAKTERI *Fusobacterium nucleatum***

**OSTEOBLAST and OSTEOCLAST RATIO ANALYSIS in WISTAR RATS
PERIAPICAL BONE RESORPTION BASED on CONCENTRATION and
INDUCTION TIME that INDUCED by *Fusobacterium nucleatum***

Disertasi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Doktor
Program Studi Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh :

JUNI JEKTI NUGROHO

P0200309048

Kepada:

**PROGRAM S3 KEDOKTERAN PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2015**

DISERTASI

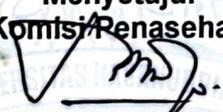
**ANALISIS RASIO OSTEOLAS DAN OSTEOKLAS PADA
RESORPSI TULANG PERIAPIKAL TIKUS WISTAR
BERDASARKAN KONSENTRASI DAN LAMA INDUKSI
BAKTERI *Fusobacterium nucleatum***

Disusun dan diajukan oleh

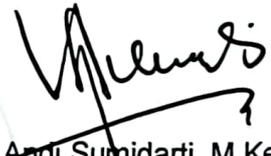
JUNI JEKTI NUGROHO
Nomor Pokok P0200309048

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 29 Desember 2014
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat,


Prof. Dr. drg. Latief Mooduto, MS, SpKG(K).
Promotor


Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, M.Sc, SpGK(K).
Ko-Promotor


Dr. drg. Andi Sumidarti, M.Kes.
Ko-Promotor

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran,

Dekan Fakultas Kedokteran


Prof. dr. Mochammad Hata, SH., SpMK(K).


Prof. Dr. dr. A. Asadul Islam, SpBS.

Direktur Program Pascasarjana
Universitas Hasanuddin


Prof. Dr. Syamsul Bahri, SH., MS

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Juni Jekti Nugroho

Nomor Pokok : P0200309048

Program Studi : S3 Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana

Universitas Hasanuddin Makassar

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau seluruhnya disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 18 Desember 2014

yang menyatakan,

Juni Jekti Nugroho

PANITIA PENGUJI

1. Prof.Dr.drg Latief Mooduto, MS., SpKG (K) (Promotor/Penguji)
2. Prof.Dr.dr Suryani As'ad M.Sc., SpGK (K) (Ko- promotor/Penguji)
3. Dr.drg Andi Sumidarti, M.Kes (Ko- promotor/Penguji)
4. Dr.drg Tamara Yuanita MS., SpKG (K) (Penguji Eksternal)
5. Prof.Dr.drg Rasmidar Samad ,MS (Penguji)
6. Dr.dr Burhanuddin Bahar ,MS (Penguji)
7. Dr.drg Indriya Kirana Matulada ,MS (Penguji)
8. Dr.drg Irene E. Rieuwpassa, MS.i (Penguji)

PRAKATA

Bismillaahir Rahmaanir Rahiim

Perkenankanlah penulis memanjatkan puji dan syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karuniaNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini. Penulis menyadari sepenuhnya disertasi ini dapat diselesaikan berkat bantuan, bimbingan, arahan, saran, koreksi dan dukungan dari berbagai pihak. Dengan hati yang tulus perkenankan penulis menghaturkan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

1. **Ibu Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA** selaku Rektor Universitas Hasanuddin, **Bapak Prof. Dr. dr. Idrus Patturusi, SpBO**, selaku Rektor Universitas Hasanuddin periode 2006-2014 atas berkenan dan diterimanya penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan studi pada Program Doktorat Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin.
2. **Bapak Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam**, selaku Dekan Fakultas Kedokteran, dan **Bapak Prof. dr. Irawan Yusuf, Ph.D** selaku Dekan Fakultas Kedokteran periode sebelumnya yang telah memberikan izin mengikuti pendidikan ini.
3. **Bapak Prof. dr. Mochammad Hatta, PhD, SpMK (K)** selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin, dan **Prof. Dr. dr. Suryani As'ad MSc, SpGK (K)** selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin periode sebelumnya yang telah memberi kesempatan melanjutkan Program Pendidikan Doktor. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan membalas amal kebaikan beliau.
4. **Bapak Prof. Dr. Syamsul Bahri SH, MH** selaku Direktur Program Pascasarjana Unhas dan **Bapak Prof. Dr. Ir. Mursalim, MS** selaku Direktur

Program Pascasarjana Unhas periode sebelumnya, atas berkenan dan diterimanya penulis untuk mengikuti dan menyelesaikan studi pada Program Doktoral Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin.

5. **Bapak Prof. Dr. drg. Latief Mooduto, MS., SpKG (K)** selaku Promotor yang selalu memberikan perhatian dan penuh kesabaran membimbing, memotivasi, membantu, memperluas wawasan keilmuan serta memberikan saran dan dukungan moril secara terus-menerus, sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada beliau.
6. **Ibu Prof. Dr. dr Suryani As'ad M.Sc., SpGK (K)** selaku Ko-promotor. Terimakasih yang sebesar-besarnya atas segala bimbingan dorongan dan kepercayaan serta kesempatan untuk melaksanakan penelitian dan menyelesaikan pendidikan ini. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada beliau.
7. **Ibu Dr. drg Andi Sumidarti, M.Kes** selaku Ko-promotor. Terimakasih yang sebesar-besarnya atas segala bimbingan dorongan dan kepercayaan serta kesempatan untuk melaksanakan penelitian dan menyelesaikan pendidikan ini. Semoga Allah selalu melimpahkan rahmat dan hidayahNya kepada beliau.
8. **Dr. drg. Tamara Yuanita MS., SpKG (K)** selaku penguji eksternal; **Prof. Dr. drg. Rasmidar Samad, MS; Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS; Dr. drg. Indriya Kirana Matulada, MS; Dr. drg. Irene E. Rieuwpassa, MS.i** selaku penguji yang sangat kompeten dibidangnya yang tidak lelah memberikan masukan, saran-saran dan nasehat yang sangat berguna bagi penyempurnaan disertasi ini. Semoga selalu dalam lindungan dan rahmat-Nya.

9. **Ibu Dr. Drg Retno Pudji Rahayu, MKes** selaku konsultan Patologi Mulut dan **Dr. drh. Wiwik Misako, MKes** selaku konsultan dokter hewan, yang sangat kompeten dibidangnya yang tidak lelah membantu, memberikan masukan, saran-saran dan nasehat yang sangat berguna bagi pelaksanaan penelitian ini. Semoga selalu dalam lindungan dan rahmat-Nya.
10. **Bapak Prof. drg. Mansjur Nasir, PhD**, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin, dan **Prof. drg. Moh. Dharmautama, PhD Sp Pros (K)** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi periode sebelumnya, atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Pendidikan Doktoral di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.
11. **Ibu drg. Nurhayati Natsir, PhD, SpKG**, selaku Ketua Departemen Konservasi dan **Ibu Dr. drg. Andi Sumidarti, MKes**, selaku Ketua Departemen Konservasi periode sebelumnya atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Pendidikan Doktoral di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.
12. Seluruh Staf pengajar Bagian Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin, yaitu **drg. Vero Harsinen Sanusi; Dr. drg. Indriya Kirana Matulada, MS; Dr Med Dent. Rehatta Yongki; Dr. drg. Andi Sumidarti, MKes; drg. Maria Tanumihardja, MDSc; drg. Nurhayati Natsir, PhD, SpKG; drg. Hafsah Katu, MKes; drg. Ardo Sabir, MKes; drg. Aries Chandra Trilaksana, SpKG; drg. Christine Anastasia Rovani, SpKG; drg. Wahyuni Suci, SpKG** atas segala kesempatan, bantuan, bimbingan dan arahan dalam menjalani pendidikan.
13. Bapak dan ibunda tercinta, **H. Hudijarso Wibowo, BSc** (almarhum) dan **Hj. Hidajatin** yang tak pernah berhenti mengirimkan doa-doa terbaiknya. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada beliau.

14. Bapak dan ibu mertua terhormat, **H. Ome Manne** dan **Hj. Saenab** yang terus memberikan dukungan moril dan materi serta doa. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada beliau.
15. Khusus untuk suamiku tercinta **H. Ir. Agussalim Ome** dan anak-anakku tersayang, **Annisa Meydina** dan **Aisyah Dwi Anjani** yang selalu mendukung, memberikan semangat dan doa serta pengorbanan yang sangat besar dengan penuh kesabaran dan pengertiannya mendampingi penulis, penulis minta ampun dan ridha.
16. Kepada teman seperjuangan angkatan 2009, **drg. Asdar Gani, MKes; Dr. drg. Eka Erwansyah, MKes, Sp Orto; drg. Eddy Heriyanto Habar, Sp Orto; drg. Ike Damayanti Habar, Sp Pros** dan **drg. Aries Chandra Trilaksana, SpKG** atas dukungan dan kerjasamanya yang tak terlupakan.
17. Seluruh pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah membantu saya menyelesaikan pendidikan ini.
- Saya juga menghaturkan maaf sebesar-besarnya apabila terdapat kesalahan dalam penyusunan disertasi ini.

Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua dan berkenan menjadikan disertasi ini bermanfaat.

Makassar, 08 Januari 2015

Juni Jekti Nugroho

Abstrak

Juni Jekti Nugroho. Analisis Rasio Osteoblas Dan Osteoklas Pada Resorpsi Tulang Periapikal Tikus Wistar Berdasarkan Konsentrasi Dan Lama Induksi Bakteri *Fusobacterium nucleatum*.

(Dibimbing oleh : **Latief Mooduto, Andi Sumidarti, Suryani As'ad**)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dinamika rasio sel osteoblas : osteoklas pada inflamasi periapikal yang di induksi bakteri *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) dengan konsentrasi berbeda pada periode waktu tertentu. Penelitian ini merupakan eksperimental laboratoris dengan *the post test only control group design*. Terdapat 48 sampel gigi tikus Wistar yang dibagi dalam 9 kelompok. Kelompok A: gigi di induksi bakteri *Fn* dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml, kelompok B: gigi di induksi bakteri *Fn* dengan konsentrasi 10^{10} CFU/ml dan kelompok C: kelompok kontrol tanpa induksi bakteri. Masing-masing kelompok dibagi lagi sesuai lama induksi bakteri, yaitu 1, 7, dan 21 hari. Hasil analisis menunjukkan bahwa pada hari ke-1 rasio $10^{10} : 10^8$ CFU/ml yaitu 2.36 : 1. Hal ini menunjukkan bahwa pada hari ke-1 dinamika rasio osteoblas : osteoklas di dominasi oleh osteoblas, baik pada konsentrasi 10^8 maupun 10^{10} CFU/ml. Sedangkan pada hari ke-7 sampai hari ke-21 di dominasi oleh osteoklas. Artinya, semakin tinggi konsentrasi bakteri yang diberikan pada subyek maka semakin tinggi rasio osteoblas : osteoklas.

Kata kunci: *Fusobacterium nucleatum*, konsentrasi bakteri, resorpsi periapikal, osteoblas, osteoklas

Abstract

Juni Jekti Nugroho. Osteoblast and osteoclast ratio analysis of periapical bone resorption Wistar rats based on concentration and induction time that induced by *Fusobacterium nucleatum*.

(Supervised by : **Latief Mooduto, Andi Sumidarti, Suryani As'ad**)

This study aimed to investigate the dynamics of the osteoblast : osteoclast cell ratio at the periapical inflammation induced by *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) using different concentrations at a certain time.

This study was a laboratory experiment with the post test design of the control group. There were 48 samples of Wistar mouse teeth which were divided into 9 groups. Group A: teeth were induced using *Fn* bacteria with the concentration 10^8 of CFU/ml, Group B: teeth were induced using *Fn* bacteria with the concentration 10^{10} of CFU/ml, and Group C: teeth – the control group – were not induced using any bacteria. Each group was then divided according to the time length of induction: i.e. 1, 7, and 21 days.

The analysis result revealed that on day one, the ratio was $10^{10} : 10^8$ of CFU/ml, i.e. 2.36 : 1. This indicated that on day 1, the dynamic ratio of the osteoblast : osteoclast was dominated by osteoblasts, both at 10^8 concentration and at 10^{10} concentration of CFU/ml. While on day 7 up to day 21 the ratio was dominated by osteoclast. This means that the higher bacterium concentration given to a subject, the higher the ratio between osteoblast : osteoclast.

Keywords: *Fusobacterium nucleatum*, bacterium concentration, periapical resorption, osteoblast, osteoclast.

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Pernyataan Keaslian Disertasi	iii
Halaman Panitia Penguji	iv
Prakata	v
Abstrak	viii
Abstract	ix
Daftar isi.....	x
Daftar Gambar	xiii
Daftar Tabel dan Grafik	xiv
Daftar Singkatan	xv
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	7
C. Tujuan Penelitian	8
D. Manfaat Penelitian	9
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Inflamasi Jaringan Pulpa Dan Periapikal	10
B. Klasifikasi Lesi Periapikal	11
Periodontitis Apikalis	11
C. Bakteri Gram Negatif <i>Fusobacterium nucleatum</i>	15
D. Komponen Sel tulang	19

E. Diferensiasi sel osteoklas dan osteoblas.....	21
Sel Osteoklas	21
Sel Osteoblas	21
F. Peran Sitokin Pada Respon Inflamasi Periapikal.....	23
 BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
A. KERANGKA TEORI	28
B. KERANGKA KONSEP	29
C. VARIABEL PENELITIAN	30
D. HIPOTESIS	30
 BAB IV METODE PENELITIAN	
A. Desain Penelitian.....	32
B. Unit Eksperimen dan jumlah sampel	32
C. Definisi Operasional Variabel	33
D. Lokasi dan Waktu Penelitian	34
E. Pelaksanaan Penelitian	35
F. Alur Penelitian	38
 BAB V HASIL PENELITIAN	
A. HASIL PENELITIAN	39
 BAB VI PEMBAHASAN	
A. PEMBAHASAN	44
 BAB VII SIMPULAN DAN SARAN	
A. KESIMPULAN PENELITIAN	50
B. SARAN PENELITIAN	51

DAFTAR PUSTAKA	52
----------------------	----

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Lesi Endodontik	12
2. Keseimbangan RANKL-OPG	14
3. Regulasi sitokin pada resorpsi tulang periapikal	26

DAFTAR TABEL DAN GRAFIK

1. Tabel 1. Rasio osteoblas : osteoklas antara kelompok konsentrasi bakteri pada tiap periode waktu..... 40
2. Grafik rasio osteoblas : osteoklas antara kelompok konsentrasi bakteri pada tiap periode waktu..... 40
3. Tabel 2. Perbedaan rasio sel osteoblas : osteoklas antara kelompok konsentrasi pada tiap periode waktu..... 41
4. Tabel 3. Rasio sel osteoblas : osteoklas antara periode waktu setelah induksi bakteri pada tiap konsentrasi..... 42
5. Tabel 4. Perbedaan rasio sel osteoblas : osteoklas antara periode waktu (1 hari, 7 hari, dan 21 hari) setelah induksi bakteri pada tiap konsentrasi..... 43

DAFTAR SINGKATAN

ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
CFU	: <i>colony forming units</i>
ECM	: <i>Extracellular matrix</i>
EDTA	: <i>Etilenediaminetetraaceticacid</i>
Ca(OH) ²	: <i>Calcium Hydroxide</i>
CD-14	: <i>Cluster Differentiation-14</i>
GAGs	: <i>Glikosaminoglikans</i>
GM-CSF	: <i>Granulocyte Macrophage –Colony Stimulating Factor</i>
(IFN) γ	: <i>interferon γ</i>
IL-1	: <i>Interleukin -1</i>
IL-2	: <i>Interleukin -2</i>
IL-4	: <i>Interleukin -4</i>
IL-6	: <i>Interleukin -6</i>
IL-8	: <i>Interleukin -8</i>
IL-10	: <i>Interleukin -10</i>
IL12	: <i>Interleukin -12</i>
IL-1 α	: <i>Interleukin -1α</i>
IL-1 β	: <i>Interleukin -1β</i>
IKKs	: <i>inhibitor of NFκB kinase</i>
LBP	: <i>Lipopolisacharide binding protein</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
MMPs	: <i>Matrix metalloproteinases</i>
NO	: <i>Nitrit Oxide</i>

OCL	: <i>Osteoclast-like cells</i>
OPG	: <i>Osteoprotegerin</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PMN	: <i>Polymorphonuclear</i>
RANKL	: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor $\kappa\beta$ Ligand</i>
RANK	: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor κ</i>
RSPTI	: <i>Rumah Sakit Penyakit Tropik dan Infeksi</i>
Th-1	: <i>T helper -1</i>
Th-2	: <i>T helper -2</i>
TLR-4	: <i>Toll-like Receptor-4</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TRAP	: <i>Tartrate resistance-associate receptor</i>
T-reg	: <i>T- regulatory</i>
TIMPs	: <i>Tissue Inhibitory Metalloproteinases</i>

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Mempertahankan gigi selama mungkin di dalam rongga mulut merupakan salah satu tujuan kesehatan gigi, khususnya di bidang ilmu konservasi gigi. Idealnya gigi dalam keadaan utuh, vital dan berfungsi dengan baik, tetapi selama pemakaian dapat terjadi kerusakan pada email dan dentin yang pada akhirnya melibatkan jaringan pulpa. Umumnya pasien datang ke dokter gigi jika sudah merasakan sakit atau dengan kerusakan yang parah. Data yang dikeluarkan Depkes RI dari RisKesDa tahun 2007 menunjukkan bahwa 72,1% penduduk Indonesia mempunyai pengalaman gigi berlubang (karies) dan sebanyak 46,5% diantaranya adalah karies aktif yang belum dirawat. (Ruslan BO, 2002)

Karies merupakan jalan masuk mikroorganisme ke dalam ruang pulpa. (Craig, 2004) Kerusakan gigi yang melibatkan jaringan pulpa dapat disebabkan oleh agen fisik, kimiawi dan bakterial. Agen bakterial merupakan penyebab paling umum kerusakan pulpa. Kerusakan dapat bersifat reversibel maupun ireversibel tergantung dari kemampuan pulpa untuk memperbaiki diri. (Ingle, 2008) Infeksi pulpa dapat menyebabkan perkembangan inflamasi yang seringkali diikuti oleh nekrosis jaringan pulpa, yang dapat menyebabkan infeksi kronis, penyebaran inflamasi ke apikal gigi, dan pembentukan lesi yang disertai resorpsi tulang periapikal. (Abbot, 2004; Dana.TG dkk, 2011) Kerusakan periapikal memegang peranan terhadap kegagalan perawatan saluran akar gigi. Kegagalan perawatan saluran akar ditandai dengan berlanjutnya resorpsi

jaringan periapikal. Resorpsi yang berlebihan akan mengganggu keseimbangan proses remodeling tulang. Namun mekanisme kerusakan periapikal gigi masih menjadi perdebatan sampai sekarang. (Cohen dkk, 2002; Nair, 2004)

Pada sebagian besar bentuk inflamasi akut (simptomatik), *polimorphonuclear* (PMN) akan mendominasi infiltrat inflamasi selama 6 sampai 24 jam pertama, kemudian digantikan oleh makrofag sebagai sel yang dominan dalam inflamasi kronis dalam 24 sampai 48 jam. Hal ini berkaitan dengan usia PMN yang singkat setelah masuk jaringan, sel-sel ini mengalami apoptosis dan lenyap setelah 24-48 jam, sedangkan makrofag bertahan lebih lama (Robbins & Cottran, 2011). Makrofag merupakan respon imun adaptif dalam pembentukan sitokin *proinflammatory*. Sitokin yang dihasilkan oleh makrofag pada proses kerusakan tulang diantaranya adalah *interleukin-1* (IL-1), *interleukin-6* (IL-6) dan *tumor nekrosis factor* (TNF). (Rong F, 2011) Oleh karena itu pola inflamasi periapikal dapat diamati melalui keberadaan makrofag dengan menggunakan variabel waktu sebagai standar pengamatan pola inflamasi.

Prevalensi periodontitis apikal yang berkaitan dengan gigi yang telah dirawat saluran akar sebesar 16-64,5%. Angka kegagalan perawatan saluran akar yang meningkat berhubungan dengan inflamasi pada daerah periapikal. (Yan MT, 2006)

Inflamasi dan resorpsi tulang di apikal gigi, pada kebanyakan kasus, merupakan akibat interaksi antara infeksi bakteri dan respon *host*. Peran penting bakteri dalam patogenesis penyakit pulpa dan apikal telah diketahui. (Dana.TG dkk, 2011; Al-Asfour, 2013) Salah satu karakteristik periodontitis

apikal adalah resorpsi tulang periapikal, yang berhubungan dengan respon imun terhadap infeksi bakteri. Nair (2004) mendefinisikan periodontitis apikal sebagai penyakit inflamasi jaringan periradikular yang disebabkan oleh persistensi infeksi bakteri di dalam sistem saluran akar gigi. Saluran akar nekrosis menjadi lingkungan yang ideal untuk habitat bakteri rongga mulut. Hal ini difasilitasi oleh kurangnya pertahanan *host* karena hilangnya sirkulasi fungsional dalam saluran akar, namun dipengaruhi juga oleh tubulus dentinalis pada dinding saluran akar yang menjadi jalur masuknya bakteri dan kolonisasinya ke pulpa gigi. (Al-Asfour, 2013)

Terdapat beberapa respon inflamasi periapikal, yang disertai dengan resorpsi tulang disekitar gigi yang terkena. Diantara lesi perapikal yang sangat mengganggu adalah terjadinya lesi periapikal simtomatik yaitu 35%, 50% periapikal granuloma dan hanya 15% periapikal kista. (Yan M.T, 2006)

Lesi periapikal merupakan kerusakan patologis yang mempengaruhi jaringan periodonsium di sekitar periapikal. Karakteristik penyakit ini ditandai dengan rusaknya tulang dan ligamen periodontal di sekitar periapikal akibat adanya invasi bakteri yang menginfeksi saluran akar dan berlanjut menjadi inflamasi periapikal. Kejadian ini memicu berbagai reaksi imunologi berupa pelepasan mediator-mediator inflamasi seperti. (Zhang & Peng, 2005; Rittling S.R dkk, 2010; Graunaite I dkk, 2011; Silva M.J.B dkk, 2012)

Periodontitis apikalis terjadi akibat respon inflamasi lokal, yang dimediasi oleh adanya infiltrasi sel inflamasi dan produk-produknya. Proses inflamasi pada akhirnya menyebabkan resorpsi tulang periapikal, yang merupakan aktivitas dari osteoklas. *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand* (RANKL) merupakan anggota baru dari golongan besar TNF yang mengikat

Receptor Activator of Nuclear Factor κ (RANK) dan memiliki peran penting dalam mengatur diferensiasi, aktivasi dan kelangsungan hidup osteoklas pada kejadian osteoklastogenesis. (Rong F dkk, 2011; Silva M.J.B dkk, 2012)

Pada kondisi inflamasi ini selain sel-sel inflamasi yang banyak berperan, juga terdapat sel osteoklas yang memiliki fungsi seperti makrofag. Osteoklas merupakan salah satu sel tulang, sel tulang juga terdiri atas osteoblas dan osteosit. Sel tulang berfungsi untuk membentuk tulang, meresorpsi tulang, keseimbangan mineral dan perbaikan tulang. (Aubin & Bonnellye, 2002) Matriks tulang tersusun atas kolagen yang berasal dari osteoblas dan protein non-kolagen yang mengalami mineralisasi. Komponen mineral dan organik yang menyusun matriks tulang berperan dalam membentuk sifat kekerasan dan kekuatan tulang, kerusakan pada salah satu dari komponen tersebut dapat menyebabkan kerapuhan tulang. (Philipp JT dkk, 2010)

Inflammatory bone resorption merupakan suatu proses regulasi kompleks yang melibatkan beberapa sitokin dan interaksi antara berbagai jenis sel. Sel utama yang berperan pada resorpsi tulang adalah osteoklas. (Coon D, 2007) Patogenesis resorpsi tulang periapikal sangat kompleks dan melibatkan hubungan antara bakteri dan *host*. (Siqueira & Rocas, 2005) Pada kasus disertai gejala nyeri (simptomatik), *Fusobacterium nucleatum* (*F.nucleatum*) adalah bakteri yang paling sering ditemukan dalam kasus nyeri pra-operatif (57,1%) dan post-operatif (66,6%). (Guimaraez dkk, 2012) *Fusobacterium*, merupakan spesies yang paling sering menempati rongga mulut, yaitu pada plak gigi dan sering dihubungkan dengan penyakit periodontal. Spesies *Fusobacterium* seringkali ditemukan dalam infeksi regio kepala dan leher, dengan beberapa laporan yang mengindikasikan bahwa spesies

Fusobacterium dapat dideteksi pada hampir 52% spesimen. Dalam flora rongga mulut *F.nucleatum* paling sering berkembang biak dalam abses gigi akut, dan dilaporkan prevalensi sebesar 73%. (Zhang S dkk, 2010)

Fukada S.Y dkk, (2009) melakukan penelitian untuk menginduksi lesi periapikal pada gigi tikus menggunakan kombinasi 4 macam bakteri yaitu *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella nigrescens*, *Actinomyces viscosus* dan *Fusobacterium nucleatum* dan terbukti pembentukan lesi periapikal terjadi setelah masa induksi selama 21 hari.

Sebagian besar pengetahuan kita tentang mikroflora endodontik didasarkan pada penelitian kultur. Hal ini karena dulu, kita tidak memiliki alternatif lain. Kultur masih menjadi standar emas bagi para dokter gigi di klinik untuk mengidentifikasi target perawatan tertentu dan mengevaluasi strategi perawatannya, karena aksesnya lebih mudah dibandingkan teknik-teknik baru seperti teknik biologi molekuler untuk mengetahui karakteristik komposisi flora mikroba saluran akar lebih dekat. (Fouad, 2009) Pada prosedur perawatan saluran akar sebelum dilakukan tahapan obturasi perlu dilakukan pemeriksaan sterilitas saluran akar dengan melakukan kultur bakteri saluran akar. *Paper point* steril dimasukkan ke saluran akar untuk mendapatkan sampel cairan jaringan, kemudian dicelupkan pada tabung inokulasi yang berisi media cair, bisa berupa kaldu atau agar. Tabung di inkubasi pada suhu 37,5°C selama ± 7 hari. Sterilitas saluran akar diketahui dari kekeruhan larutan pada tabung inokulasi yang bisa dilihat secara kasat mata. Sampel yang tidak menunjukkan perkembangbiakan (sampel negatif) menunjukkan bahwa saluran akar tidak mengandung mikroorganisme hidup, jadi tujuan perawatan berhasil dicapai. Untuk menghindari false-negatif, sampel yang diambil haruslah adekuat dan

representatif, yang terkadang sulit dilakukan. Selama perawatan, mikroorganisme di saluran akar utama mudah, namun yang berada di tubulus dentinalis, saluran lateral, dan delta apikal lebih sulit di jangkau. Transportasi dan kultur harus dilakukan dengan hati-hati agar bakteri yang hidup dan dapat dikultur memiliki kesempatan untuk berkembangbiak. (Fouad, 2009)

Keseimbangan antara osteoklas dan osteoblas sangat penting untuk meregulasi osteoklastogenesis. Penelitian ini ingin mengevaluasi dinamika rasio sel osteoblas : osteoklas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *Fusobacterium nucleatum* dengan konsentrasi yang berbeda pada periode waktu tertentu.

B. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang seperti yang disebutkan di atas, maka diajukan rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah terdapat peningkatan jumlah osteoklas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^8 pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari?
2. Apakah terdapat peningkatan jumlah osteoklas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^{10} pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari?
3. Apakah terdapat penurunan jumlah osteoblas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^8 pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari?

4. Apakah terdapat penurunan jumlah osteoblas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^{10} pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari?
5. Apakah terdapat dinamika rasio sel osteoblas : osteoklas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi antara 10^8 dan 10^{10} pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari?

C. TUJUAN PENELITIAN

1. Tujuan umum

Menentukan rasio sel osteoklas dan osteoblas pada terjadinya resorpsi tulang periapikal gigi tikus Wistar dengan periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi berbeda dan pada periode waktu tertentu.

2. Tujuan khusus

1. Menentukan adanya peningkatan jumlah osteoklas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^8 pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari
2. Menentukan adanya peningkatan jumlah osteoklas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^{10} pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari
3. Menentukan adanya penurunan jumlah osteoblas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^8 pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari

4. Menentukan adanya penurunan jumlah osteoblas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^{10} pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari
5. Menentukan adanya dinamika rasio sel osteoblas : osteoklas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi antara 10^8 dan 10^{10} pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari

D. MANFAAT PENELITIAN

1. Manfaat Teoritis :

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah pada ilmu Konservasi Gigi khususnya di bidang Endodontik mengenai aktivitas osteoklas dan osteoblas pada terjadinya resorpsi tulang periapikal gigi tikus Wistar dengan periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum*, sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut apakah periodontitis apikalis eksperimental ini dapat secara signifikan menimbulkan kerusakan tulang periapikal tikus Wistar.

Manfaat Praktis :

Dengan mengetahui dinamika rasio osteoblas : osteoklas pada resorpsi tulang periapikal tikus Wistar, maka hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan untuk penentuan strategi pencegahan inflamasi jaringan periapikal agar tidak berlanjut menjadi periodontitis apikalis, sehingga perawatan saluran akar bisa lebih cepat dan angka keberhasilan perawatan bisa lebih ditingkatkan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Inflamasi Jaringan Pulpa Dan Periapikal

Inflamasi merupakan mekanisme penting yang diperlukan tubuh untuk mempertahankan diri dari bahaya seperti kerusakan jaringan. Iritasi terhadap jaringan pulpa dapat disebabkan oleh berbagai hal antara lain mikroorganisme yang dapat memicu respon tubuh, pada jaringan pulpa dikenal sebagai pulpitis atau inflamasi jaringan pulpa. (Torneck & Torabinejad, 1998; Trownbridge, 2002)

Pulpitis merupakan respon positif yang sangat diperlukan untuk kembali pada keadaan sebelum dan sesudah trauma untuk memperbaiki diri. Respon inflamasi pulpa sangat tergantung pada pembuluh darah dan cairan yang beredar dalam pembuluh darah. Apabila tubuh berhasil mempertahankan kondisi homeostasis dan pengaruh yang merugikan, akan terjadi perbaikan jaringan yang rusak. Keadaan ini dikenal sebagai pulpitis reversibel. Jika iritan atau bakteri berjalan terus dan intensitasnya meningkat, maka akan terjadi inflamasi pulpa yang parah atau dikenal sebagai pulpitis ireversibel yang kemudian dapat menyebabkan kematian jaringan pulpa dan dapat berlanjut pada inflamasi di daerah periapikal. (Torneck & Torabinejad, 1998; Trownbridge, 2002; Dana T.G., dkk. 2011)

Lesi periapikal atau dikenal dengan lesi endodontik dapat terbentuk dari jaringan pulpa yang terpapar bakteri rongga mulut sebagai akibat dari berkurangnya integritas gigi tersebut. Hal ini dapat disebabkan oleh lesi karies yang mampu melarutkan jaringan keras gigi yang mengalami demineralisasi,

struktur gigi yang fraktur, serta faktor iatrogenik dan kondisi lainnya yang memungkinkan bakteri untuk melakukan penetrasi ke dalam jaringan pulpa. (Dana T.G., dkk. 2011)

B. Klasifikasi Lesi Periapikal

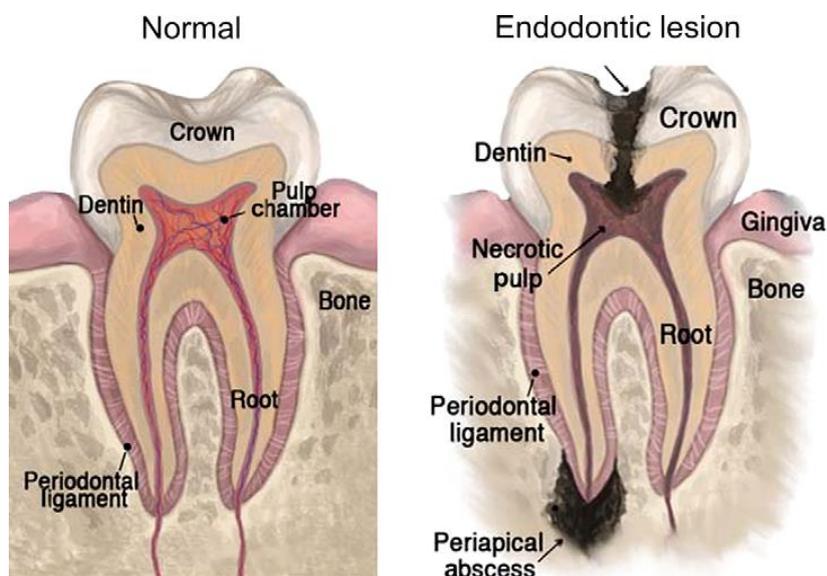
Lesi periapikal dapat diklasifikasikan berdasarkan temuan klinis dan histologis. Sama dengan penyakit pulpa, terdapat korelasi antara tanda klinis, gejala dan durasi lesi dibandingkan dengan gambaran histologis. Berdasarkan hal tersebut maka lesi periapikal diklasifikasikan menjadi enam kelompok yaitu : jaringan periapikal normal, periodontitis apikalis simtomatik (akut), periodontitis apikalis asimtomatik (kronis), *condensing osteitis*, abses apikal akut dan abses apikal kronis. (Torabinejad & Walton, 2009)

Periodontitis apikalis

Periodontitis apikalis merupakan lanjutan dari infeksi saluran akar yang berkembang mencapai daerah periapikal, merupakan kemampuan respon pertahanan tubuh terhadap bakteri yang berasal dari saluran akar. Proses tersebut menghasilkan inflamasi lokal, resorpsi jaringan tulang serta kerusakan pada jaringan periapikal dan pada akhirnya terjadi kelainan pada jaringan periapikal. (Nair, 2004)

Periodontitis apikalis merupakan suatu kondisi inflamasi dan destruksi jaringan periradikular yang disebabkan oleh penyebaran materi inflamasi dari pulpa gigi yang terinfeksi ke dalam jaringan periradikular. Agen penyebabnya adalah spesies berbagai bakteri yang mencapai pulpa gigi akibat lesi karies, infeksi endodontik, atau trauma. Pada fase awal periodontitis apikalis, inflamasi hanya terjadi di ruang ligamen periodontal apikal tanpa disertai resorpsi tulang.

Namun bakteri yang menetap di daerah tersebut pada akhirnya akan berkembang menjadi periodontitis apikalis kronis. Kondisi ini mengakibatkan resorpsi tulang periapikal dan berpotensi membentuk kista, tergantung pada virulensi spesies bakteri yang menginvasi. Untuk mengatasi kondisi tersebut, dibutuhkan perawatan endodontik. (Graunaite I dkk, 2011; Georgios N.B. dkk, 2011)

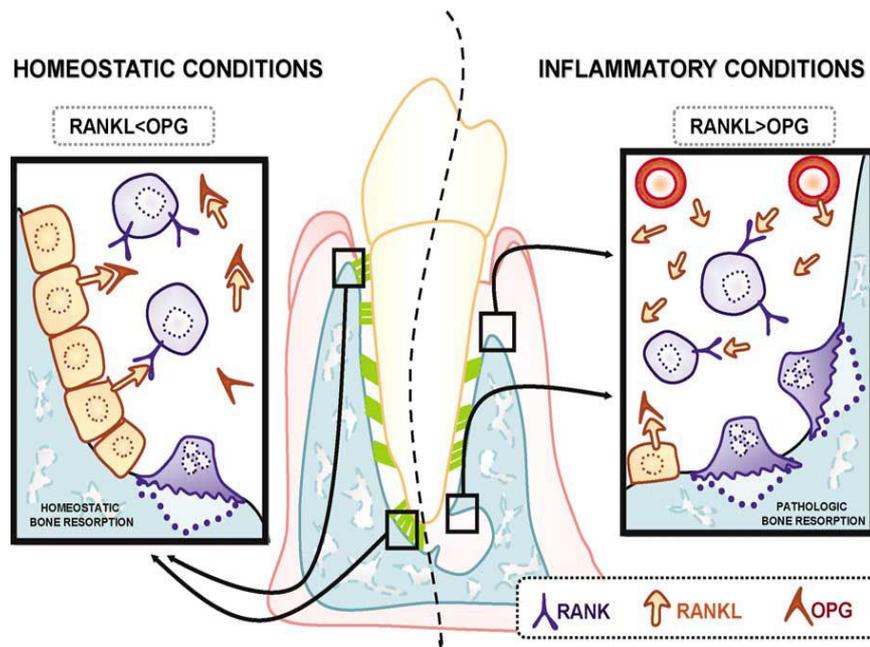


Gambar 1. Lesi periapikal. Pada lesi periapikal kerusakan terjadi akibat trauma atau akibat bakteri kariogenik. Bakteri mengkontaminasi pulpa, kemudian gigi mengalami nekrosis dan membentuk kumpulan bakteri yang menyebabkan inflamasi pada daerah periapikal dan resorpsi tulang. (Dana T.G. dkk, 2011a)

Respon inflamasi melibatkan pengerahan dan aktivasi leukosit dari respon imun alami dan adaptif, menyebabkan osteoklasogenesis dan pembentukan lesi osteolitik pada apikal gigi. (Dana TG dkk, 2011)

Perkembangan lesi yang lambat menyebabkan resorpsi tulang yang tampak secara radiografis. (Vier FV & Figueiredo JAP, 2005) Inflamasi dan resorpsi tulang pada apikal gigi, pada sebagian besar kasus merupakan akibat dari interaksi antara infeksi bakteri dan respon *host*. Infeksi yang muncul pada jaringan pulpa gigi nekrosis tidak dapat ditembus oleh leukosit dan oleh karena itu, menjadi ruang penyimpanan bakteri yang aman dan terisolasi. Inflamasi kronis yang distimulasi oleh bakteri dan produknya pada area periapikal gigi akan mengarah pada resorpsi tulang yang terlokalisir sehingga tidak terjadi pembentukan tulang reparatif jika tidak dilakukan perawatan. Pada akhirnya terjadi pembentukan dan perluasan granuloma atau kista dalam jaringan periapikal. (Graunaite I. dkk, 2011; Dana, TG dkk, 2011)

Secara khusus, sinyal reseptor IL-1 dibutuhkan untuk mencegah perluasan infeksi dari pulpa nekrosis ke permukaan dan untuk melindungi *host* dari kerusakan dan kematian pulpa yang mungkin terjadi. Oleh karena itu, terdapat kompleksitas yang harus diperhitungkan dalam memeriksa pengaruh pemberian sinyal terhadap sitokin karena sitokin memiliki peran destruktif disamping fungsi protektif yang penting dalam pertahanan anti bakteri. Hal ini bertolak belakang dengan penyakit periodontal, dimana tidak ada akumulasi bakteri yang terisolasi. Oleh karena itu, lesi yang berasal dari periapikal lebih rentan terhadap infeksi bakteri dengan hambatan respon *host* dibanding penyakit periodontal. (Dana TG dkk, 2011a)



Gambar 2. Keseimbangan RANKL/OPG merupakan faktor penting yang mengatur resorpsi tulang pada periodontal dan periapikal. Diferensiasi dan aktivasi osteoklas diatur oleh interaksi RANK-RANKL. Osteoprotegerin, merupakan reseptor RANKL yang menghambat ikatan RANK-RANKL. Pada kondisi homeostatis (sisi kiri), level RANKL dan OPG berada dalam keadaan seimbang sehingga osteoklasogenesis dan resorpsi tulang terkontrol. Pada kondisi terdapat stimulus inflamasi, rasio RANKL:OPG meningkat pada jaringan periodontal dan periapikal sehingga aktivitas osteoklas dan resorpsi tulang patologis meningkat. (Dana T.G., dkk. 2011b)

Meskipun pemeriksaan radiografi merupakan informasi yang penting dalam diagnosis klinis, namun jarang dapat membantu dalam diagnosis resorpsi akar berukuran kecil yang berhubungan dengan gigi yang mengalami periodontitis apikal. (Silva TA dkk, 2007) Teknik ini memiliki beberapa kelemahan, dimana radiografi standar tekniknya sensitif/rumit, hanya dapat mendeteksi resorpsi setelah terbentuk secara luas, dan hanya memberikan informasi dua dimensi. Selain itu, penggunaan periodik radiografis meningkatkan paparan radiasi bagi pasien. (George A, Evans C.A, 2009)

C. Bakteri Gram Negatif *Fusobacterium nucleatum*

Rongga mulut merupakan kumpulan berbagai jenis mikroorganisme. Meskipun mikroorganisme dapat berupa bakteri, virus atau jamur, dalam rongga mulut bakteri cenderung mendominasi dibandingkan mikroorganisme lainnya. Saluran akar nekrosis menjadi lingkungan yang ideal untuk habitat bakteri rongga mulut. Hal ini difasilitasi oleh kurangnya pertahanan *host* karena hilangnya sirkulasi fungsional dalam saluran akar namun dapat juga dipengaruhi oleh tubulus dentinalis yang berpori pada dinding saluran akar. Tubulus dentinalis menjadi jalur masuknya mikroorganisme ke pulpa gigi dan kolonisasinya. Meskipun di dalam rongga mulut terdapat ratusan spesies, hanya sedikit spesies yang ditemukan di dalam saluran akar (sekitar 20-30 spesies saja). Faktor-faktor yang mempengaruhi lingkungan bakteri dalam saluran akar adalah suhu, pH, reseptor bakterial, nutrisi yang tersedia, dan tekanan oksigen. (Al-Asfour, 2013)

Bakteri fakultatif umumnya adalah koloni perintis pada saluran akar. Pada saat suplai oksigen dan darah berkurang akan terciptalah lingkungan anaerobik dimana bakteri anaerob mendominasi. Anaerob mampu bertahan dalam lingkungan yang ekstrim karena mampu memproduksi nutrisi sendiri dari jaringan pulpa nekrosis, eksudat inflamasi, komponen saliva, atau produk-produk metabolit bakteri. (Al-Asfour, 2013)

Bakteri berkoloni di dalam saluran akar dalam bentuk biofilm. Biofilm merupakan kluster berbagai spesies bakteri yang berkoagregasi dengan bentuk komunitas mikrobial kompleks yang terintegrasi. Pada tahun 2010, Ricucci menemukan susunan biofilm dalam 77% intraradikular saluran akar yang diteliti. Keberadaan spesies bakteri di dalam biofilm meningkatkan perkembangbiakan dan resistensinya terhadap antimikroba,

perkembangbiakannya meluas, diversitas metaboliknya meningkat, kompetisi dengan mikroorganisme lain berkurang, terjadi pertukaran genetik, patogenesis dan nutrisi simbiotik meningkat. Tubulus dentinalis yang terinfeksi ditemukan pada 70-80% dari semua lesi periodontitis apikal. (Al-Asfour, 2013)

Perkembangan inflamasi pulpa pada daerah periapikal dan kolonisasi bakteri sistem saluran akar mengarah pada respon imun *innate* dan adaptif, akibatnya terjadi kerusakan tulang alveolar periapikal dan pembentukan lesi periapikal. Pada saat bersamaan, akan terjadi resorpsi struktur jaringan keras gigi, sementum dan dentin, yang mengakibatkan berkurangnya stabilitas gigi secara bermakna. (Silva T.A. dkk, 2007)

Inflamasi dan resorpsi tulang periapikal, dalam sejumlah kasus, merupakan akibat interaksi antara infeksi poli bakterial dan respon *host*. Peranan bakteri dalam perkembangan lesi periapikal diperlihatkan dengan mengekspos pulpa gigi di rongga mulut hewan bebas bakteri. Pulpa yang terbuka pada hewan bebas bakteri mengalami penyembuhan yang disertai inflamasi sementara, dan perbaikan parsial pada gigi yang dimediasi melalui pembentukan matriks baru serupa dentin pada area yang terbuka. (Dana T.G dkk, 2011)

Resorpsi tulang periapikal distimulasi secara khusus oleh beberapa bakteri atau produk bakteri, termasuk lipopolisakarida (LPS). Bakteri diperkirakan menginisiasi resorpsi melalui stimulasi monosit dan makrofag yang nantinya menghasilkan sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 β , IL-1 α atau TNF- α . Adanya molekul pro-inflamasi, IL-1, dan LPS ke dalam saluran akar menggunakan model tikus terbukti meningkatkan diameter lesi apikal. (Dana T.G dkk, 2011)

Pulpa yang nekrosis akan menjadi lingkungan yang memungkinkan bakteri memperbanyak diri dan melepaskan berbagai toksin ke dalam jaringan periapikal, sehingga dimulailah reaksi inflamasi dan kemudian berkembang menjadi pembentukan lesi periapikal. (Thomas S.B. dkk, 2000)

Periodontitis apikalis diinisiasi oleh interaksi mikroflora dari saluran akar yang mengalami infeksi. Masuknya bakteri beserta produknya yang terus-menerus melalui foramen apikal menginduksi aktivasi dan interaksi antara sel imun-inflamasi yang terkoordinasi dalam area periapikal. Kemampuan mobilisasi mekanisme pertahanan *host* tidak terbatas pada membunuh bakteri yang menginvasi, namun juga menghasilkan komponen jaringan normal serta menginduksi resorpsi tulang, sehingga menyebabkan gigi terlepas dari soketnya. (Menezes R dkk, 2008b)

Fusobacterium nucleatum adalah bakteri filamentosa obligat anaerob, Gram negatif. *F. nucleatum* menonjol di antara flora bakteri plak gigi dan subgingiva pada kondisi sehat ataupun berpenyakit, jumlah tertinggi melebihi batas normalnya seringkali ditemukan pada daerah gingivitis atau periodontitis. Bakteri ini dapat memicu periodontitis pada tikus gnotobiotik mono-infeksi. (Rajendra PS dkk, 2012; Okahashi N dkk, 1988) Patogenesitas spesies *Fusobacterium* ini berhubungan dengan endotoksinya yaitu lipopolisakarida (LPS). LPS dari *F. nucleatum* bersifat letal bagi embrio tikus, dan kelinci. LPS juga dapat mengaktivasi komplemen pada manusia serta menstimulasi resorpsi tulang. (Okahashi N dkk, 1988)

Sejak tahun 80-an, karena kemajuan kultur bakteri dan teknik identifikasi, dibuktikan bahwa saluran akar gigi-geligi yang mengalami nekrosis pulpa dengan lesi periapikal kronis yang nampak dalam gambaran radiografik,

didominasi oleh anaerob murni, terutama bakteri gram-negatif. Pada kasus disertai gejala nyeri (simptomatik), *F. nucleatum* adalah bakteri yang paling sering ditemukan dalam kasus nyeri pra-operatif (57,1%) dan post-operatif (66,6%). (Guimaraez dkk, 2012)

Metzger dkk (2009) menemukan bahwa *F.nucleatum* dapat meningkatkan perlekatan *P.gingivalis* pada sel-sel *host*, salah satu bakteri paling potensial pada kejadian abses periradikular. Mereka menjelaskan bahwa bakteri tersebut kemungkinan berinteraksi dengan koloni muda plak gigi serta dengan banyak koloni lain, dan berperan sebagai penghubung antara koloni yang baru dan yang lama. Proses ini kemungkinan dapat meningkatkan persistensi beberapa strain bakteri pada area yang terinfeksi, menyebabkan pembentukan struktur biofilm yang kompleks. (Zhang S dkk, 2010) Pada sebuah penelitian abses gigi yang berasal dari periodontal maupun dari endodontik, Sabiston & Gold (1990) menemukan *F.nucleatum* sebanyak 7 dari 8 infeksi yang diteliti. (William BL dkk, 1993)

D. Komponen Sel Tulang

Komponen sel terdiri atas empat tipe sel yaitu: sel osteoprogenitor, osteoblas, osteosit dan osteoklas. (Deftos, 2002) Sel tulang berfungsi untuk membentuk tulang, resorpsi tulang, keseimbangan mineral dan perbaikan tulang. Sel tulang berasal dari sel mesenkim dan sel stem hematopoetik. Sel pembentuk tulang yang berasal dari sel mesenkim akan mengalami diferensiasi menjadi preosteoblas, osteoblas, sel *lining* tulang atau *resting osteoblas* dan osteosit. Sel tulang yang berasal dari sel stem hematopoetik adalah sel yang terdapat pada sumsum tulang maupun peredaran darah. Susunan sel tulang

terdiri dari 95% osteosit, dan 5% terbagi atas 94% sel tulang *lining*, 5% osteoblas dan 1% osteoklas. (Aubin & Bonnellye 2002)

Osteoblas memiliki peran besar dalam proses remodeling tulang. Fungsinya tidak hanya terbatas pada pembentukan tulang, tetapi saat ini telah dipastikan bahwa osteoblas bertanggungjawab untuk mengawali resorpsi tulang. Osteoblas mampu menstimuli dan mengontrol perilaku osteoklas, suatu kondisi yang terjadi melalui interaksi sel. (Graunaite I dkk, 2011)

Proses remodeling meliputi dua aktivitas yaitu: proses resorpsi tulang (*bone resorption*) yang diikuti oleh proses pembentukan tulang baru (*bone formation*), proses yang pertama dikenal sebagai aktivitas osteoklas sedang yang kedua dikenal sebagai aktivitas osteoblas (Murray, 2003). Osteoblas berasal dari mesenkim dan merupakan sel yang bertanggung jawab atas sintesis matriks tulang. Osteoklas berasal dari hematopoietik dan satu-satunya sel yang mampu meresorpsi mineral tulang. Interaksi antara osteoblas dan osteoklas menjamin keseimbangan antara pembentukan dan kehilangan tulang (Manolagas, 1995; Lemaire V dkk, 2004; Baron, 2006)

Remodeling tulang memberikan kesempatan adaptasi terhadap pengaruh mekanik dan mempertahankan homeostasis fosfor dan kalsium melalui fase pembentukan dan resorpsi yang terkoordinasi. Osteoblas berdiferensiasi dari *stem cell* mesenkim melalui serangkaian tahapan progenitor untuk membentuk osteoblas matur yang mensekresikan osteoblas dan bertransformasi secara progresif menjadi osteosit. Osteoblas dan osteosit dihubungkan oleh *gap junction*, sehingga membentuk jaringan selular di permukaan tulang dan pada matriks tulang.

Osteoklas merupakan protagonis utama pada resorpsi tulang. Osteoklas meresorpsi tulang dengan cara berikatan dengan permukaan, dan mensekresikan proton dalam sebuah kompartemen ekstraselular. Sekresi ini dibutuhkan untuk pelarutan mineral tulang dan digesti matriks organik oleh protease asam. (Theoleyre S dkk, 2004; Patel S dkk, 2010; Dana TG dkk, 2011)

E. Diferensiasi sel Osteoklas dan Osteoblas

Sel Osteoklas

Osteoklas merupakan sel raksasa berinti banyak yang dibentuk oleh fusi dari sel prekursor mononuklear berasal dari sel hematopoietik pada sum-sum tulang yang merupakan prekursor monosit/makrofag. (Manolagas & Jilka, 1995) Sel ini kaya dengan enzim lisosom yang meliputi *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP) (Baron, 2006).

Prekursor osteoklas ini masih merupakan sel mononuklear. Sel ini akan berdiferensiasi menjadi *Osteoclast-like cells* (OCL). Prekursor osteoklas dengan pengaruh sitokin IL-6 mengadakan fusi membentuk sel multinuklear osteoklas yang selanjutnya berfungsi meresorpsi tulang (Lorenzo dkk, 2008).

Osteoklas berasal dari sel prekursor hematopoietik lapisan monosit/makrofag. Sel stromal dan prekursor osteoblas mengekspresikan suatu anggota kelompok *TNF-ligand* yang disebut RANKL. Ligan permukaan sel ini menstimulasi osteoklasogenesis dan aktivitas osteoklas dengan berikatan pada reseptor umpannya, yaitu RANK, pada permukaan prekursor osteoklas. *Macrophage colony-stimulating factor* juga diperlukan untuk diferensiasi dan pertahanan hidup osteoklas. RANKL diekspresikan oleh osteoblas/sel stromal, fibroblas, dan sel T yang telah diaktivasi. (Menezes R dkk, 2008b)

Sel Osteoblas

Osteoblas adalah sel pembentuk tulang yang berasal dari sel progenitor dan ditemukan di permukaan tulang. Sel ini bertanggung-jawab pada pembentukan dan proses mineralisasi tulang. (Manolagas & Jilka, 1995; Baylink dkk, 1999)

Fungsi osteoblas adalah mensintesis dan mensekresi matriks organik tulang serta mengatur perubahan elektrolit cairan ekstrasel pada proses mineralisasi. Osteoblas ditemukan dalam kelompok sel kuboid pada permukaan tulang. Osteoblas merupakan sel normal dengan inti bulat atau oval dan terdiri dari satu inti atau lebih. Letak Inti tersebut tidak berada di tengah. Lapisan matriks tulang dibentuk osteoblas dan yang belum mengalami kalsifikasi disebut osteoid. Osteoblas akan berubah pada fase akhir menjadi sel lapisan tipis yang disebut osteosit. Osteoblas yang menetap pada permukaan tulang akan menurun kemampuan sintetisnya dan bentuknya menjadi pipih kemudian akan menjadi *bone lining cells*. Osteoblas yang berada di tengah matriks akan menjadi osteosit dan sebagian besar akan menghilang. Osteoblas memproduksi protein struktural seperti kolagen, osteokalsin, sialoprotein tulang dan protein regulator berupa *growth factor* dan sitokin lain. Osteoblas memulai mineralisasi melalui pengaturan aliran elektrolit antara cairan ekstrasel dan intraselular. Osteoblas saling berhubungan melalui *gap junction* yang memungkinkan komunikasi antar sel melalui elektrik dan kimia. Osteoblas diklasifikasikan sebagai sel yang khusus meskipun osteoblas sebenarnya tidak berhenti berdiferensiasi. Sel osteoblas berpoliferasi dan berdiferensiasi dipengaruhi oleh sejumlah faktor transkripsi, *growth factor* dan hormonal. (Aubin & Bonnellye, 2002)

Osteoblas dilepas dan dibuat melalui prekursor osteoblas dalam bentuk yang aktif sebagai hasil resorpsi osteoklasik dari matriks tulang menghasilkan protein matriks tulang. (Mackie, 2003) Kolagen tipe 1 merupakan protein mayor dalam matriks tulang, sekitar 90 % dari matriks organik. Kolagen berserat tipe 1 membangun struktur dimana mineral tulang diletakkan. (Mackie, 2003) Osteoblas juga mensekresi protein non kolagen termasuk proteoglikan, glikoprotein dan protein karboksilat. (Robey, 2001)

Osteoblas mensintesis kolagen dan *glycosaminoglycans* (GAGs) dari matriks tulang dan berperan dalam proses mineralisasi tulang. Osteoblas yang matang akan mengekspresikan beberapa senyawa kimia yang bisa digunakan sebagai identifikasi aktivitas osteoblas dalam serum yang biasa diberi istilah *biochemical bone marker* yaitu kolagen tipe I, alkaline fosfatase, Osteopontin dan Osteocalcin. (Robling dkk, 2006)

F. Peran Sitokin Pada Respon Inflamasi Periapikal

Sitokin memainkan peran utama dalam respon inflamasi dan imun dalam *microenvironment* tulang. Keseimbangan antara mediator pro dan anti inflamasi menentukan tingkat resorpsi pada penyakit yang menimbulkan destruksi tulang, termasuk lesi periapikal. (Menezes R dkk, 2008a)

Lesi periapikal merupakan kondisi inflamasi desktruktif yang menyerang periodonsium periapikal. Ditandai dengan kerusakan tulang dan ligamen periodontal periradikular akibat infeksi bakteri dalam pulpa gigi. Berbagai macam mediator inflamasi, seperti IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), nitrit oksida (NO), interferon (IFN) γ , prostaglandin, dan metaloproteinase seringkali dihubungkan dengan lesi periradikular. Meskipun pengetahuan kita tentang

patogenesis lesi periradikular terus berkembang, mekanisme resorpsi tulang dan pengaturan sitokin, serta kondisi patologis yang berhubungan dengan proses kerusakan tulang periapikal belum diketahui dengan pasti. (Vernal R dkk, 2006)

Lesi periapikal dipicu oleh infeksi kronis pulpa gigi. Antigen bakteri menstimulasi respon imun non-spesifik dan spesifik dalam jaringan periapikal. Oleh karena mekanisme pertahanan tubuh tidak mampu untuk menghilangkan infeksi, lesi periapikal kronis akan terbentuk, dengan tujuan untuk membatasi invasi bakteri. (Colic M dkk, 2009)

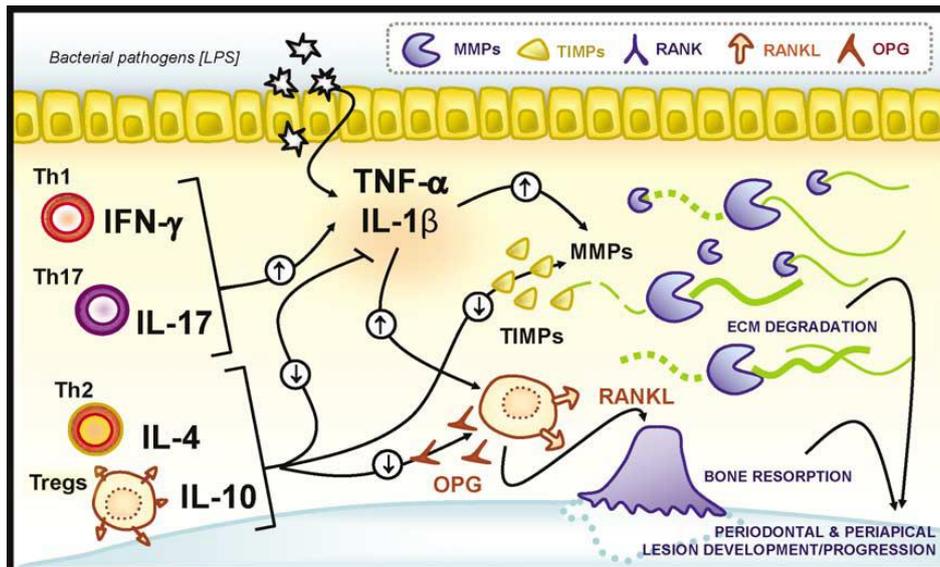
TNF- α diproduksi baik oleh makrofag maupun limfosit Th-1. Lipopolisakarida yang dilepaskan dari saluran akar terinfeksi, menstimulasi makrofag untuk mensekresikan sitokin proinflamasi, seperti IL-1 dan TNF- α . Efek biologis dari TNF- α meliputi aktivasi leukosit seperti limfosit (sel T dan B), makrofag dan sel *natural killer*; menginduksi demam, pelepasan protein fase akut, ekspresi gen sitokin dan kemokin serta aktivasi sel endotelial. Sitokin ini dilaporkan dapat menstimulasi resorpsi tulang, dan IL-1 ditemukan 500 kali lipat lebih potensial dibanding TNF- α dalam memediasi resorpsi tulang. (Graunaite I dkk, 2011)

Makrofag memiliki peran sentral dalam regulasi destruksi dan perbaikan jaringan ikat; imunitas alami, imunitas nonspesifik dan mula kerja, regulasi dan produk antigen spesifik, serta imunitas yang didapat (*acquired*). Sebagai respon terhadap serangan bakteri atau aktivasi sinyal alami lainnya, maka dihasilkan berbagai molekul biologis aktif yakni sitokin IL-1, TNF- α , IL-8, IL-6, GM-CSF, IL-12, IL-10, *growth factors*, *metabolit arachidonic acid*, radikal bebas dan enzim metalloproteinase. (Graunaite I dkk, 2011)

Jaringan sitokin yang kompleks disekresikan di dalam periapiks sebagai respon terhadap infeksi pulpa oleh fibroblast dan infiltrat makrofag-monosit serta limfosit. Sitokin ini merangsang aktivitas osteoklas dan resorpsi tulang periapikal melalui mekanisme yang belum diketahui dengan pasti. (Vernal R dkk, 2006)

Lesi periapikal berhubungan dengan multipel sitokin proinflamasi dan kemokin. IL, khususnya IL-1 α dan IL-1 β diproduksi dalam lesi periapikal oleh beberapa tipe sel termasuk makrofag, osteoklas, PMNs, dan fibroblast. Peran IL-1 dalam menstimulasi destruksi tulang periapikal didemonstrasikan menggunakan antagonis reseptor IL-1 untuk menunjukkan reduksi perkembangan lesi sebesar 60%. Tampak bahwa banyak aktivitas osteoklasogenik yang terinduksi dalam lesi periapikal secara spesifik berkaitan dengan pembentukan IL-1 α . Sinyal reseptor IL-1 yang hilang seluruhnya menyebabkan terjadi peningkatan ukuran lesi dan kematian jaringan. Selain itu, ekspresi TNF- α telah diidentifikasi dalam lesi periapikal oleh sel seperti PMNs, monosit/makrofag, dan fibroblast serta dapat berkontribusi terhadap pembentukan lesi. (Dana T.G dkk, 2011b)

Sel T mampu mengatur osteoklasogenesis melalui produksi RANKL dan IFN- γ . RANKL merupakan salah satu molekul khusus yang ditemukan pada permukaan sel T yang telah diaktivasi dan diketahui mengaktifkan sel yang meresorpsi tulang. (Graunaite I dkk, 2011)



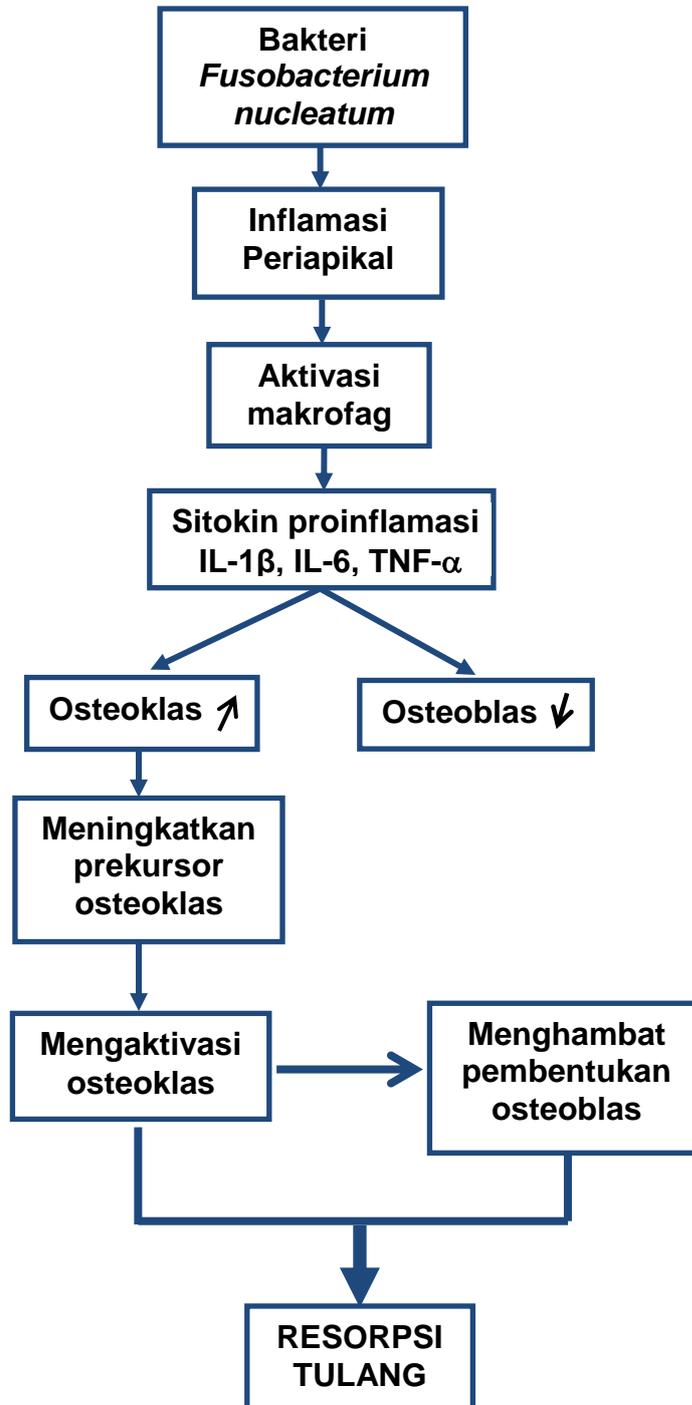
Gambar 4. Regulasi sitokin yang menyebabkan degradasi matriks dan resorpsi tulang pada periapikal dan periodontal. Patogen bakteri pada periodontal dan periapikal memicu sitokin proinflamatori, seperti TNF- α dan IL-1 β , yang menstimulasi ekspresi dan aktivasi MMPs dan menghancurkan matriks jaringan pengikat. TNF- α dapat menstimulasi osteogenesis dan sitokin lainnya menstimulasi RANKL yang mengarah ke pembentukan aktivitas osteoklas. Kombinasi dan adaptasi respon imun cenderung mengarah ke tingkat inflamasi dan resorpsi tulang lebih lanjut. Sitokin proinflamatori ini berperan dalam proses lesi periodontal dan periapikal. Sebaliknya, sitokin yang diproduksi oleh Th-2 dan T-reg, seperti IL-4 dan IL-10 memiliki efek yang berbeda, menstimulasi pembentukan TIMPs, dan OPG. (Dana TG dkk, 2011b)

Periodontitis apikalis timbul sebagai akibat respon inflamasi lokal, yang dimediasi oleh sel inflamasi yang berinfiltrasi beserta produknya. Proses inflamasi secara khusus menyebabkan resorpsi tulang periapikal, yang merupakan fungsi unik dari osteoklas. *Receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$ ligand*, RANK, dan OPG memainkan peran penting dalam meregulasi diferensiasi, aktivasi dan ketahanan hidup osteoklas baik dalam kondisi sehat maupun sakit. (Rong F dkk, 2011)

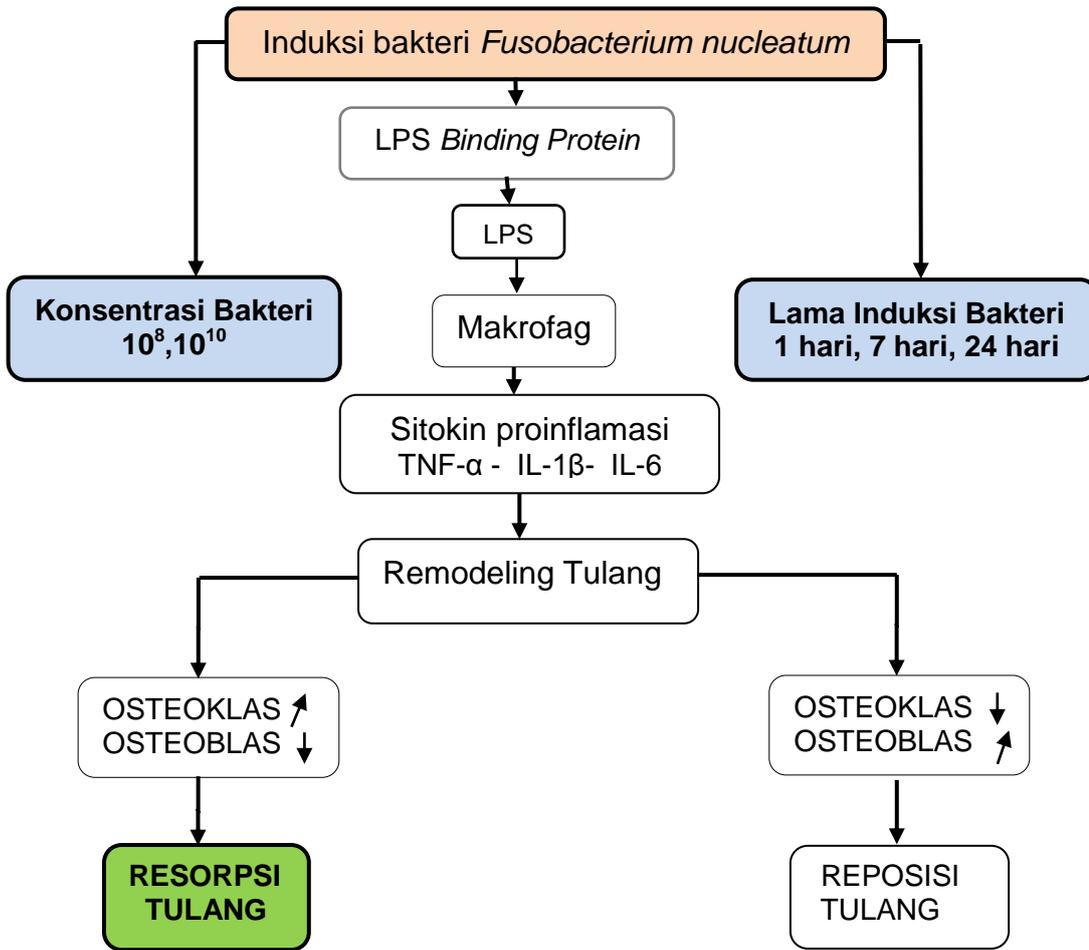
BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

A. KERANGKA TEORI



B. KERANGKA KONSEP



variabel bebas



variabel kendali



variabel tergantung



C. VARIABEL PENELITIAN

Variabel bebas : induksi bakteri *F.nucleatum*

Variabel tergantung : resorpsi tulang periapikal

Variabel kendali : umur, berat badan, jenis kelamin, pemeliharaan,
dan gigi tikus, masa induksi, konsentrasi dan
jenis bakteri, anestetikum

D.HIPOTESIS PENELITIAN

1. Terdapat peningkatan jumlah osteoklas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^8 pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari
2. Terdapat peningkatan jumlah osteoklas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^{10} pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari
3. Terdapat penurunan jumlah osteoblas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^8 pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari
4. Terdapat penurunan jumlah osteoblas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^{10} pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari

5. Terdapat dinamika rasio sel osteoblas : osteoklas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi antara 10^8 dan 10^{10} pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan binatang coba tikus putih dengan strain Wistar. Desain penelitian yang digunakan adalah *the one post test only group design* dengan pengukuran variabel yang dilakukan setelah pemberian perlakuan.

B. UNIT EKSPERIMEN DAN JUMLAH SAMPEL

1. Unit eksperimen

Unit eksperimen adalah tikus putih dengan strain Wistar jantan yang diperoleh dari Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia FK Unair Surabaya, dewasa, umur 4-5 bulan, berat badan antara 400-450 gram.

Sampel penelitian adalah gigi insisivus rahang bawah yang memenuhi persyaratan sebagai berikut :

Kriteria inklusi : Sehat selama \pm 14 hari masa observasi sebelum penelitian dan 21 hari selama masa penelitian, dapat dilihat dengan bulu yang halus dan mobilitas yang normal.

Kriteria eksklusi : Hewan terdeteksi sakit atau memiliki kelainan bawaan yang

dinyatakan oleh dokter hewan konsultan.

2. Jumlah sampel

Dihitung dengan menggunakan rumus dari Daniel W.W (1991) sebagai berikut :

$$n = \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2(1,74)^2}{(1,5)^2} = 5,14 \approx 6$$

Keterangan :

n = jumlah sampel tiap kelompok

Z = harga standar normal yang didapat pada table Z dengan $\alpha = 0,05$

d = penyimpangan yang masih dapat ditolerir

σ = Standar Deviasi

Jika jumlah kelompok perlakuan ada 6 dan kelompok kontrol ada 3, maka jumlah sampel tiap perlakuan dapat dihitung $r \geq 6$. Jadi jumlah sampel keseluruhan adalah 48 gigi tikus.

C. DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL

1. Bakteri *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 10^8 dan 10^{10} CFU/ml.
2. Konsentrasi bakteri adalah jumlah sel bakteri dalam suatu cairan kultur (*broth*) atau medium cair yang dihitung dengan menggunakan alat densitometer, satuan jumlah bakteri ialah CFU/ml.
3. Periode waktu dalam penelitian ini ditetapkan berdasarkan lamanya induksi bakteri *F.nucleatum* pada gigi insisivus rahang bawah tikus Wistar, yaitu; 1 hari, 7 hari dan 21 hari.
4. Osteoblas adalah sel berbentuk kuboid yang terletak pada permukaan tulang. Jumlah osteoblas dihitung pada preparat yang diwarnai dengan HE dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali/lapang pandang.
5. Osteoklas adalah sel dengan banyak inti dan berkontak langsung dengan permukaan tulang. mempunyai sitoplasma yang berwarna pucat dan *foamy* serta bentuk inti tidak teratur. Jumlah osteoklas dihitung pada preparat

yang diwarnai dengan HE dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali/lapang pandang.

D. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

1. Lokasi penelitian

Pemeliharaan dan pengerjaan hewan coba dilaksanakan di Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia FK Unair Surabaya, Uji Imunohistokimia dilaksanakan di Rumah Sakit Penyakit Tropik dan Infeksi (RSPTI) Unair Surabaya.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan dalam kurun waktu 2 bulan, mulai bulan Agustus sampai dengan bulan Oktober 2014.

E. PELAKSANAAN PENELITIAN

1. Persiapan penelitian

Proposal penelitian ini telah mendapat persetujuan Komisi Etik Penelitian Kesehatan pada binatang pada Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin No.1619/H4.8.4.5.31/PP36-KOMETIK/2013.

2. Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan untuk menentukan konsentrasi bakteri dan lamanya induksi sampai terjadi fase inflamasi akut (periodontitis apikalis).

Disiapkan 24 ekor (48 gigi) tikus putih strain Wistar yang dibagi menjadi 9 kelompok, yaitu 2 kelompok konsentrasi bakteri, 3 kelompok periode waktu dan 4 kelompok kontrol. Kelompok I diinduksi dengan 10^8 CFU/ml bakteri *F.nucleatum* selama 1 hari, kelompok II diinduksi dengan 10^8 CFU/ml selama 7 hari, kelompok III diinduksi dengan 10^8 CFU/ml selama 21 hari, kelompok IV diinduksi dengan 10^{10} CFU/ml selama 1 hari, kelompok V diinduksi dengan

10^{10} CFU/ml selama 7 hari, kelompok VI diinduksi dengan 10^{10} CFU/ml selama 21 hari dan selebihnya adalah kelompok kontrol tanpa di induksi bakteri. Tikus dianestesi menggunakan Ketamin 80mg/kg dan Diazepam 10mg/kg. Kemudian gigi insisivus kiri dan kanan rahang bawah tikus dipotong menggunakan *rotary diamond disk* \pm 8 mm dilanjutkan dengan menembus atap pulpa gigi menggunakan *round bur* no. $\frac{1}{4}$ sampai terlihat perdarahan dari pulpa gigi. Diinduksi dengan 10 μ l bakteri *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) menggunakan micropipet pada 10^8 CFU/ml dan 10^{10} CFU/ml selama periode waktu 1, 7, dan 21 hari ke dalam saluran akar yang telah dibuka, kemudian langsung ditumpat dengan *Glass Ionomer Restorative Cement*. Tikus-tikus di observasi selama periode waktu induksi. Kemudian tikus dimatikan dengan cara dibius menggunakan eter dan diambil rahangnya. Setelah selesai pengujian (penelitian), tikus-tikus tersebut ditanam di dalam tanah. Potongan rahang tikus direndam dalam larutan buffer formalin 10%. Rahang tikus yang telah difiksasi didekalsifikasi dalam EDTA 4%, dan dipendam dalam parafin. Seluruh rahang dipotong berukuran 4 μ m/irisan, setiap lima irisan diberi pewarnaan Hematoksilin & Eosin untuk mengidentifikasi daerah lesi. Digunakan antibodi IL-1 β untuk mengidentifikasi terjadinya infeksi periapikal.

Pembuatan sediaan blok paraffin

Jaringan dicuci dengan PBS 3-5 kali untuk membersihkan kontaminan kemudian difiksasi dengan 10% formalin. Setelah itu dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 90% dan *absolute*) masing-masing 60 menit, selanjutnya dilakukan *clearing* menggunakan *xylol* sebanyak 2 kali masing-masing selama 60 menit. Infiltrasi dilakukan dengan paraffin lunak selama 60 menit pada suhu 56-58°C kemudian dilakukan *block*

pada paraffin keras dengan cetakan lalu didiamkan selama sehari. Keesokan harinya ditempelkan pada *holder* lalu dilakukan pemotongan setebal 4µm dengan *rotary microtome*. Dilakukan *mounting* pada gelas obyek dengan 5% gelatin kemudian gelas obyek hasil blok paraffin direndam dalam *xylol* sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit kemudian dibilas dengan dH₂O selama 5 menit.

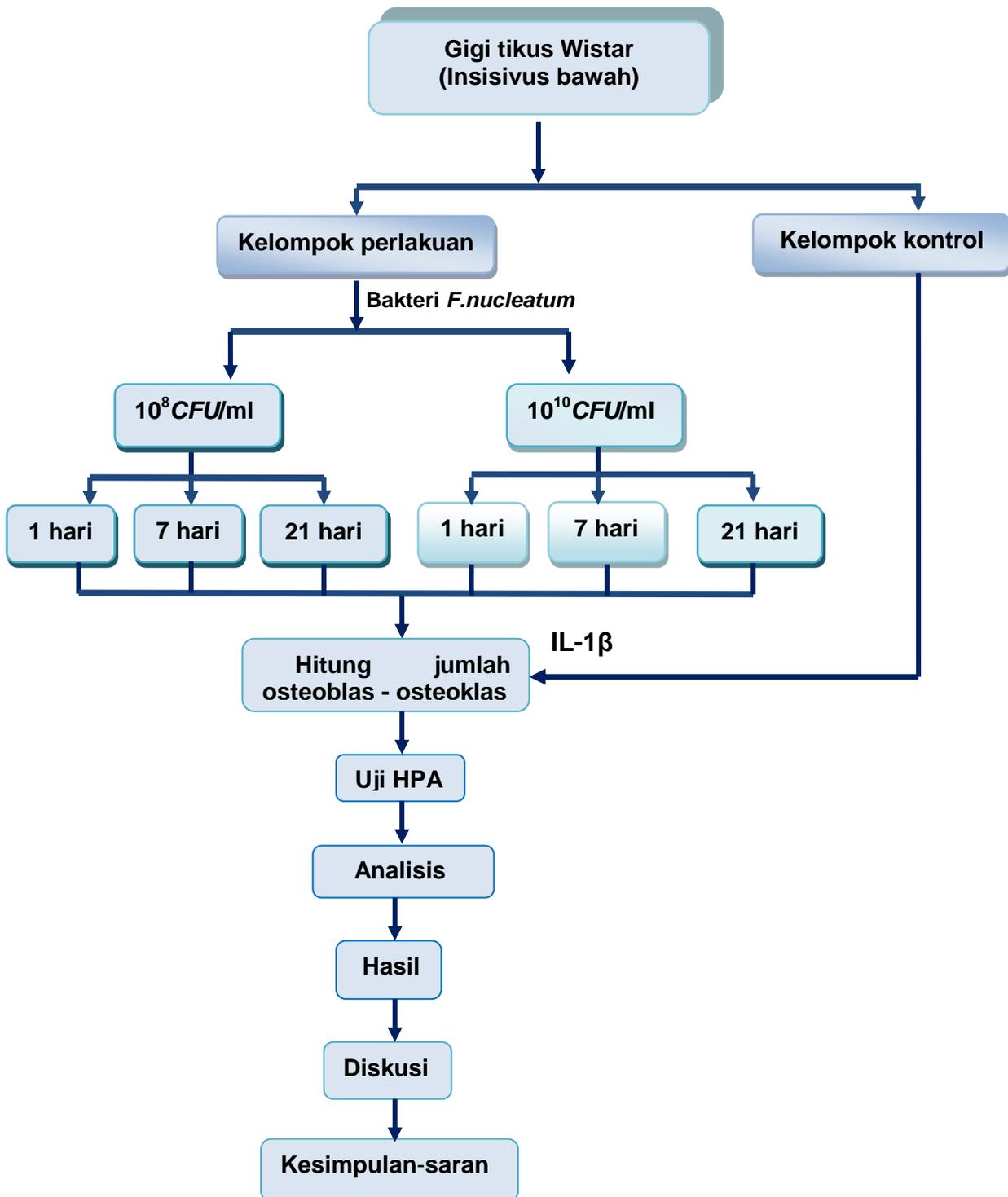
Penghitungan sel penghasil osteoklas dan osteoblas

Penghitungan sel osteoklas dan osteoblas dilakukan dengan mengamati sediaan preparat menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali/lapang pandang.

Analisis data

Analisis statistik dilakukan menggunakan metode non parametrik. Semua data yang terkumpul diolah dan dianalisa dengan program SPSS versi 18.0 dan perbandingan semua grup dilakukan dengan menggunakan uji *Willcokson*, *Kruskal Wallis* dan *Least Significant Different* (LSD) untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar perlakuan.

F. ALUR PENELITIAN



BAB V

HASIL PENELITIAN

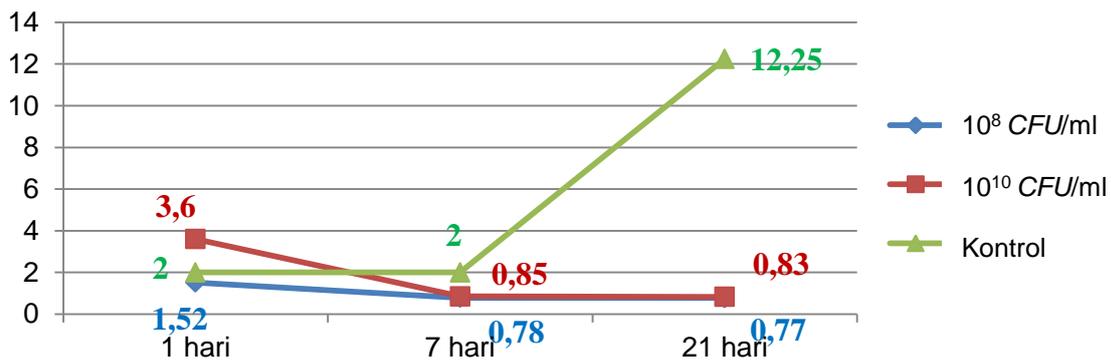
Telah dilakukan penelitian mengenai efek bakteri berdasarkan konsentrasinya terhadap jumlah sel osteoblas dan osteoklas pada periode waktu tertentu. Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2014 dan bertempat di Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia FK Unair dengan sampel penelitian adalah gigi tikus Wistar. Penelitian ini merupakan eksperimen laboratoris untuk melihat dinamika jumlah sel osteoblas dan osteoklas antara dua konsentrasi bakteri yang berbeda. Konsentrasi bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10^8 CFU/ml dan 10^{10} CFU/ml. Digunakan kontrol negatif, tanpa induksi bakteri. Penelitian ini juga bertujuan untuk mengamati dan membandingkan jumlah sel osteoblas dan osteoklas setelah induksi bakteri selama 1 hari, 7 hari, dan 21 hari.

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 7 sampel tiap kelompok konsentrasi pada berbagai waktu pengamatan setelah induksi dan 2 sampel untuk kelompok kontrol pada setiap periode waktu serupa (total 48 sampel). Untuk analisis digunakan uji statistik non-parametrik. Jumlah sel osteoblas dan osteoklas dihitung menggunakan mikroskop elektron. Hasil penelitian seluruhnya ditampilkan dalam tabel distribusi sebagai berikut.

Tabel 1. Rasio sel osteoblas : osteoklas antara kelompok konsentrasi bakteri pada tiap periode waktu

Periode waktu	Konsentrasi	Rasio Sel Osteoblas : Osteoklas
		Mean ± SD
1 hari	10 ⁸ CFU/ml	1.52 ± 1.05
	10 ¹⁰ CFU/ml	3.60 ± 2.38
	Kontrol	2.00 ± 0.0
7 hari	10 ⁸ CFU/ml	0.78 ± 0.31
	10 ¹⁰ CFU/ml	0.85 ± 0.07
	Kontrol	2.00 ± 1.41
21 hari	10 ⁸ CFU/ml	0.77 ± 0.08
	10 ¹⁰ CFU/ml	0.83 ± 0.06
	Kontrol	12.25 ± 6.71

*Kruskal Wallis test; $p < 0.05$: significant



Tabel 1 dan gambar grafik garis memperlihatkan dinamika rasio sel osteoblas : osteoklas berdasarkan periode waktu setelah diinduksi bakteri, pada tiap konsentrasi. Rasio osteoblas dan osteoklas pada konsentrasi 10⁸ CFU/ml berdasarkan periode waktu ditemukan rasio hari ke-1 adalah 1.52 sedangkan rasio pada hari-7 dan 21 menurun. Hal ini menunjukkan pada hari ke-1 jumlah osteoblas lebih dominan daripada osteoklas. Tetapi pada hari ke-7 dan 21 yang dominan adalah osteoklas. Pada konsentrasi 10¹⁰ CFU/ml terjadi hal serupa. Rasio tinggi pada hari ke-1 dan menurun pada hari ke-7 dan 21.

Kesimpulan awalnya, dibedakan antar rasio berdasarkan periode waktu. Ditemukan pada hari ke-1 rasio $10^{10} : 10^8$ CFU/ml yaitu 3.6 : 1.52 (atau rasio 2.36 : 1).

Tabel 2. Perbedaan rasio sel osteoblas : osteoklas antara kelompok konsentrasi pada tiap periode waktu

Periode waktu	Konsentrasi (i)	Pembanding (j)	Rasio Difference (i-j)	p-value
1 hari	10^8 CFU/ml	10^{10} CFU/ml	-2.0825	0.074
		Kontrol	-4.7302	0.617
7 hari	10^{10} CFU/ml	Kontrol	1.6095	0.275
	10^8 CFU/ml	10^{10} CFU/ml	-0.0766	0.025*
		Kontrol	-1.2172	0.040*
21 hari	10^{10} CFU/ml	Kontrol	-1.1406	0.040*
	10^8 CFU/ml	10^{10} CFU/ml	-0.0580	0.141
		Kontrol	-11.4719	0.040*
	10^{10} CFU/ml	Kontrol	-11.4138	0.040*

*Mann Whitney-U test: $p < 0.05$: significant

Tabel 2 memperlihatkan kerja dari konsentrasi bakteri dan kontrol pada berbagai periode waktu. Jika hasil minus berarti jumlah osteoblas lebih tinggi pada konsentrasi 10^{10} CFU/ml. Pada hari ke-1 tidak ditemukan perbedaan rasio yang signifikan antara konsentrasi $10^8 : 10^{10}$ CFU/ml. Hal serupa juga diperoleh pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Pada hari ke-7, terlihat ada perbedaan rasio yang signifikan antara konsentrasi $10^8 : 10^{10}$ CFU/ml. Namun, pada hari ke-21, perbedaan rasio antara kedua kelompok ditemukan tidak signifikan.

Tabel 3. Gambaran rasio sel osteoblas : osteoklas antara periode waktu setelah induksi bakteri pada tiap konsentrasi

Kelompok Konsentrasi	Rasio sel berdasarkan periode waktu		
	1 hari	7 hari	21 hari
	<i>Mean ± SD</i>	<i>Mean ± SD</i>	<i>Mean ± SD</i>
10^8 CFU/ml	1.52 ± 1.05	0.78 ± 0.31	0.77 ± 0.08
10^{10} CFU/ml	3.60 ± 2.38	0.85 ± 0.07	0.83 ± 0.06

**Mann Whitney-U test: p<0.05: significant*

Tabel 3 menunjukkan gambaran rasio sel osteoblas : osteoklas hari ke-1, 7 dan 21 pada tiap konsentrasi bakteri. Pada kedua kelompok, terlihat penurunan konsentrasi mulai dari hari ke-1, ke-7 dan setelah hari ke- 21. Pada hari ke-1, rasio 10^{10} : 10^8 CFU/ml sebesar 3.60 : 1.52 (atau rasio 2.36 :1). Hal ini menunjukkan bahwa jumlah sel osteoblas lebih tinggi dibandingkan jumlah sel osteoklas. Rasio 10^{10} CFU/ml yang lebih tinggi daripada 10^8 CFU/ml menunjukkan bahwa jumlah sel osteoblas lebih banyak pada konsentrasi 10^{10} CFU/ml. Pada hari ke-7, rasio 10^{10} : 10^8 CFU/ml menurun yaitu 0.85 : 0.78 (atau rasio 1.08 : 1). Hal ini menunjukkan bahwa pada hari ke-7 jumlah osteoklas lebih tinggi dibandingkan jumlah osteoblas. Rasio 10^8 CFU/ml yang lebih rendah daripada 10^{10} CFU/ml menunjukkan bahwa jumlah sel osteoklas pada konsentrasi 10^8 CFU/ml lebih banyak daripada konsentrasi 10^{10} CFU/ml. Pada hari ke-21 terjadi hal serupa, rasio 10^{10} : 10^8 CFU/ml juga menurun menjadi 0.83 : 0.77 (atau rasio 1.07 : 1). Hal ini menunjukkan bahwa jumlah sel osteoklas pada kedua kelompok konsentrasi menjadi stabil.

Tabel 4. Perbedaan rasio sel osteoblas : osteoklas antara periode waktu (1 hari, 7 hari, dan 21 hari) setelah induksi bakteri pada tiap konsentrasi

Konsentrasi	Periode waktu (i)	Pembandingan (j)	Rasio Difference (i-j)	p-value
10^8 CFU/ml	1 hari	7 hari	0.7513	0.173
		21 hari	0.7469	0.173
	7 hari	21 hari	0.0046	0.398
10^{10} CFU/ml	1 hari	7 hari	2.7501	0.028*
		21 hari	2.7733	0.028*
	7 hari	21 hari	0.0232	0.310

*Wilcoxon Signed Ranks test: $p < 0.05$: significant

Tabel 4 menunjukkan perbedaan rasio sel osteoblas : osteoklas antara periode waktu 1 hari, 7 hari, dan 21 hari pada tiap konsentrasi. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pada konsentrasi 10^8 CFU/ml, tidak terdapat perbedaan rasio yang signifikan antara hari ke-1 dan 7; hari ke-1 dan 21; serta hari ke-7 dan 21. Hal yang berbeda diperlihatkan pada konsentrasi 10^{10} CFU/ml, terdapat perbedaan yang signifikan antara hari ke-1 dan 7; hari ke-1 dan 21, namun tidak terdapat perbedaan rasio yang signifikan antara hari ke-7 dan 21.

Semakin rendah konsentrasi bakteri maka akan direspon oleh tubuh tikus dengan rasio sel osteoblas : osteoklas lebih tinggi.

BAB 6

PEMBAHASAN

Periodontitis apikal merupakan suatu kondisi inflamasi dan kerusakan jaringan periradikular. Kondisi ini timbul sebagai akibat dari berbagai gangguan terhadap pulpa gigi, meliputi infeksi, trauma fisik dan iatrogenik, prosedur endodontik, dan bahan pengisian saluran akar. (Nair, 2004)

Keberhasilan perawatan saluran akar gigi tergantung salah satunya pada hubungan kompleks respon imun antara bakteri dan *host* dalam pengendalian inflamasi terutama pada inflamasi periapikal. Kegagalan pengendalian inflamasi periapikal ditandai dengan adanya resorpsi periapikal yang menetap atau berkelanjutan walaupun telah dilakukan perawatan saluran akar gigi. (Nair, 2004) Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut namun informasi tentang mekanisme resorpsi tulang periapikal gigi tikus wistar dengan periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* masih belum jelas. Oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut agar dapat dilakukan perawatan yang sesuai sehingga kegagalan perawatan saluran akar gigi dapat di kontrol.

Bakteri memegang peran utama dalam perkembangan dan perjalanan penyakit pulpa dan periapikal termasuk resorpsi tulang (Athassiadis dkk, 2007; Graunaite I. dkk, 2011). Lesi periapikal ditandai dengan keberadaan sejumlah sel-sel inflamasi, yang bersama dengan sel-sel jaringan konektif lainnya melepaskan beberapa mediator untuk mengurangi perkembangan infeksi. Gambaran patologis yang terlihat jelas dari dilepaskannya mediator tersebut yaitu resorpsi tulang di sekitar apikal akar. Resorpsi tulang dimediasi

oleh sitokin resorpsi tulang yang dihasilkan oleh sel-sel *host* inflamasi dan non-inflamasi (Fouad, 1997; Stashenko dkk, 1998). Sitokin yang diidentifikasi pada aktivitas resorpsi tulang meliputi IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , dan IL-6 (Stashenko dkk, 1998; Manolagas, 1995; Kawashima & Stashenko, 1998; Fouad & Acosta, 2001).

Perkembangan lesi periapikal bergantung pada sitokin pro-inflamasi dan immunomodulator yang dilepaskan selama infeksi dan penghambatan inflamasi yang terjadi selama fase kronis perkembangan lesi. (Colica dkk, 2009) Telah dikemukakan bahwa sitokin pro-inflamasi seperti IFN- γ , TNF- α dan RANKL memegang peran mendasar pada kerusakan tulang periapikal (Menezes dkk, 2008).

Proses remodeling merupakan faktor fisiologis dari tulang di mana terjadi keseimbangan sel osteoblas dan osteoklas. Bila sel osteoklas lebih tinggi daripada sel osteoblas maka akan terjadi resorpsi tulang. Resorpsi yang berlebihan akan mengganggu keseimbangan proses remodeling tulang. (Nair, 2004)

Penelitian ini menggunakan gigi tikus wistar karena tikus memiliki genom yang hampir mirip atau homolog dengan manusia, serta merupakan hewan model untuk penyakit periodontal dan periapikal (Dumitrescu, 2006). Waktu yang dibutuhkan agar terjadi kelainan pada jaringan periapikal karena induksi bakteri *F.nucleatum* adalah 21 hari. (Stashenko dkk, 2007) Interaksi *imun-host* pada jaringan periapikal dimulai pada minggu I (*acute inflammatory state*), minggu II (*severe inflammatory state*), dan minggu III (*chronic inflammatory state*). Periode tersebut hampir sama dengan waktu yang dibutuhkan pada manusia untuk menimbulkan kelainan yang sama, oleh karena itu hewan coba

tikus sangat ideal digunakan sebagai model penelitian terhadap periodontitis apikalis. (Wang & Tracey, 1999)

Pada tabel 1 jumlah sel osteoblas lebih tinggi dibandingkan osteoklas dalam periode waktu 1 hari pada seluruh kelompok konsentrasi termasuk kelompok kontrol. Kita ketahui jaringan pulpa normal umumnya hanya mengandung sedikit sel inflamasi. (Al-Asfour, 2013) Meskipun ada beberapa sel osteoklas ditemukan pada hari ke-1, hal tersebut dikarenakan pada pulpa yang sehat dapat ditemukan sel osteoblas dan osteoklas. Osteoklas sebagai sel yang dominan pada osteoklastogenesis diproduksi oleh makrofag yang merupakan sel dominan pada radang kronis dan mulai masuk kedalam jaringan dalam waktu 48 jam. Sehingga pada proses peradangan awal makrofag belum tampak, hal ini berhubungan dengan jumlah sel osteoklas yang juga masih sangat sedikit. (Ingle dkk, 2008)

Pada hari ke-7 setelah induksi bakteri terlihat jumlah sel osteoklas kelompok 10^8 CFU/ml dan 10^{10} CFU/ml lebih banyak daripada jumlah osteoblas. Hal ini sesuai dengan penelitian Maeda, dkk (2002), induksi bakteri Gram negatif pada hari ke-7 merupakan awal terjadinya kerusakan pada jaringan periapikal namun belum sampai pada kerusakan lanjut yang menyebabkan resorpsi. Kerusakan awal tersebut akan meningkat pada hari ke-14 sampai hari ke-21 (fase statis), kemudian menurun pada hari ke-24 setelah terjadi keseimbangan pada tubuh. (Stashenko dkk, 1998)

Hal ini sejalan dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml dan 10^{10} CFU/ml pada pengamatan hari ke-21, jumlah sel osteoblas meningkat jauh menjadi 36.43 dan 36.14, namun masih lebih tinggi dibanding dengan jumlah sel osteoklas yang mencapai 46.86 dan 43.29.

Dinamika rasio sel osteoblas : osteoklas antara periode waktu induksi bakteri pada masing-masing kelompok konsentrasi diperlihatkan pada tabel 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok perlakuan dengan induksi bakteri *F.nucleatum* pada konsentrasi 10^8 CFU/ml dan 10^{10} CFU/ml memiliki rerata peningkatan jumlah osteoklas yang signifikan lebih tinggi daripada osteoblas, dibandingkan kelompok kontrol. Peningkatan jumlah osteoklas ini disebabkan karena efek toksik dari LPS yang menghasilkan stimulasi dari respon imun *host*. LPS merupakan stimulator yang poten dari makrofag yang dapat menginduksi sel ini untuk memproduksi beberapa mediator resorpsi tulang termasuk IL-1 dan TNF (Stashenko, 2007). Bakteri dapat meningkatkan aktivitas selular yang menstimulasi kerusakan tulang dan atau menghambat sintesis matriks tulang. (Graunaite I dkk, 2011) Respon inflamasi awal dimulai saat *F.nucleatum* mengeluarkan endotoksin berupa LPS. LPS yang dilepaskan berikatan dengan *lipopolisacharide binding protein* (LBP). Ikatan kedua komponen tersebut membentuk suatu kompleks molekul. Kompleks molekul ini akan dikenali oleh CD-14 yang berada dipermukaan sel target, kemudian dikenali oleh makrofag melalui reseptor TLR-4. Reseptor inilah yang akan mengaktifkan makrofag sebagai respon imun adaptif dengan pembentukan sitokin proinflamasi.

Dinamika rasio osteoblas : osteoklas antara kelompok konsentrasi berdasarkan periode waktu setelah induksi bakteri diperlihatkan pada tabel 4. Tidak terdapat perbedaan jumlah sel osteoblas dan sel osteoklas yang signifikan antara kelompok konsentrasi pada hari ke-1. Berbeda pada hari ke-7 dan 21, terdapat perbedaan jumlah sel osteoblas dan osteoklas yang signifikan.

Kesimpulan secara umum, pada hari ke-1 dinamika rasio osteoblas : osteoklas di dominasi oleh osteoblas, baik pada konsentrasi 10^8 maupun 10^{10} CFU/ml. Pada hari ke-7 sampai hari ke-21 di dominasi oleh osteoklas. Artinya, semakin tinggi konsentrasi bakteri yang diberikan pada subyek makin tinggi rasio osteoblas : osteoklas.

Kesimpulan akhir, pada pengamatan hari ke-1 sel-sel osteoblas dan osteoklas berada pada kondisi yang sangat dinamis, dan pada hari ke-7 sampai hari ke-21 kondisinya lebih stabil (lihat Standar Deviasi pada hari ke- 1, 7 dan 21 pada kedua konsentrasi bakteri).

Penelitian Belibasakis GN dkk (2013) pada inflamasi periapikal tikus, *osteoclast like cell*, yaitu *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP) dan RANKL, terbentuk 1 minggu setelah pulpa dibuka. Pada akhir minggu ke-2, infiltrat inflamasi padat dan terjadi resorpsi tulang periapikal yang disertai dengan klimaks TRAP dan RANKL. Setelah 4 minggu paparan, meskipun infiltrat inflamasi kronis terbentuk, keberadaan sel-sel TRAP dan RANKL menurun ke kondisi awal, dan kecepatan resorpsi tulang periapikal berkurang. Penelitian tersebut mengungkapkan keterlibatan RANKL dalam resorpsi tulang periapikal, dan mengidentifikasi bahwa puncak ekspresinya setara dengan puncak aktivitas osteoklast dan resorpsi tulang.

Penelitian Kovacevic M dkk (2008) yang menggunakan tikus sebagai binatang coba, terjadinya transisi dari pulpitis ke periodontitis apikal relatif cepat. Perkembangan pulpitis ulseratif dapat ditemukan 2-3 hari setelah pulpa terpapar bakteri. Terjadi peningkatan infiltrasi seluler dan kongesti pembuluh darah di periapiks. Tujuh hari setelah pulpa terbuka, nekrosis menyebar

sampai ke saluran akar, ditemukan banyak infiltrat sel inflamasi dalam periapeks yang disertai dengan permulaan resorpsi tulang alveolar.

Osteoklas merusak matriks tulang dengan cara memisahkan sel dengan matriks sehingga menurunkan pH dari 7 menjadi pH 4. Penurunan pH akibat aktivasi osteoklas yang besar oleh karena induksi LPS dapat mengakibatkan kerusakan struktur kristal hidroksiapatit dan struktur organik kolagen dalam tulang (Indahyani dkk, 2007).

Proses kerusakan tulang yang meningkat pada peradangan periapikal akibat induksi LPS melalui proses osteoklastogenesis bisa dihambat oleh osteoprotegerin (OPG). OPG adalah sitokin yang dihasilkan oleh osteoblas dan sel stromal *bone marrow*, berfungsi sebagai reseptor penyeimbang dan berkompetisi dengan RANK, mencegah berikatan dengan RANKL. Rasio ekspresi RANKL dan OPG penting dalam inflamasi induksi resorpsi tulang, termasuk periodontitis. Pada konsentrasi OPG relatif meningkat daripada ekspresi RANKL, OPG mengikat RANKL dan menghambatnya untuk mengikat RANK dan ketika ekspresi RANKL relatif bertambah daripada OPG, RANKL bersiap untuk mengikat RANK pada prekursor osteoklas, mengaktifkan pembentukan osteoklas dan resorpsi tulang. (Elizabeth, 2007) Mekanisme tersebut akan digunakan sebagai dasar pemikiran pada penelitian selanjutnya.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN PENELITIAN

1. Pada pengamatan hari ke-1 sel osteoblas meningkat, sedangkan pada hari ke-7 sampai 21 sel osteoklas yang meningkat.
2. Dinamika rasio sel osteoblas : osteoklas hanya berlaku antara hari ke-1 sampai hari ke-7, namun pada hari ke-7 sampai 21 stabil. Pada hari ke-1 rasio $10^{10} : 10^8$ CFU/ml yaitu 2.36 : 1. Pada hari ke-7 sampai 21 stabil dengan rasio 1.1 : 1
3. Semakin tinggi konsentrasi bakteri semakin tinggi rasio sel osteoblas : osteoklas.

Dalam bentuk lebih terinci, simpulan sebagai berikut :

1. Terdapat peningkatan jumlah osteoklas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^8 pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari
2. Terdapat peningkatan jumlah osteoklas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^{10} pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari
3. Terdapat penurunan jumlah osteoblas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^8 pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari
4. Terdapat penurunan jumlah osteoblas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi 10^{10} pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari

5. Terdapat dinamika rasio sel osteoblas : osteoklas pada periodontitis apikalis akibat induksi bakteri *F.nucleatum* dengan konsentrasi antara 10^8 dan 10^{10} pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari

B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek induksi bakteri *F.nucleatum* yang dikombinasi dengan bakteri lain yang *virulent* dan bekerja secara sinergis pada terjadinya resorpsi tulang periapikal tikus Wistar.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada tahapan *treatment* menggunakan agen *dressing* tertentu untuk mengetahui potensi hambatan agen tersebut terhadap aktivitas sitokin proinflamasi pada terjadinya resorpsi tulang periapikal tikus Wistar.

KETERBATASAN PENELITIAN

1. Dinamika rasio penelitian ini hanya berlaku pada periode waktu 1, 7 dan 21 hari saja dan tidak menjelaskan rasio diantara periode waktu tersebut.
2. Dalam pelaksanaan penelitian ini terdapat keterbatasan yaitu hanya menggunakan biomarker di tingkat selular saja, sehingga hasil penelitian kurang bisa menjelaskan fakta mengenai sitokin-sitokin proinflamasi yang terlibat pada kejadian resorpsi tulang periapikal tikus Wistar.
3. Sampel terbatas, diperlukan jumlah sampel yang cukup agar hasil penelitian bisa lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbot PV, Classification, diagnosis and clinical manifestation of apical periodontitis. *Endodontic Topics*. Copyright Blackwell Munksgaard, 2004:36-54
- Andonovska B., Dimova C., Panov S. Matrix metalloproteinases (MMP-1, -8, -13) in chronic periapical lesions. *Vojnosanit Pregl*. 2008; 65(12): 882–886.
- Andreas Jäger, Dominique Kunert, Therese Friesen, et al. Cellular and extracellular factors in early root resorption repair in the rat. *European Journal of Orthodontics* 2008; 30: 336–345
- Aubin JE and Bonnellye E. Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteogenesis and bone resorption (2002): Available from http://www.mwdscape.com/view_article/408911
- B. Athanassiadis, PV. Abbott, LJ. Walsh. The use of calcium hydroxide, antibiotic and biocide as antimicrobial medicaments in endodontics. *Australian Dental Journal Supplement* 2007;52 (1 Suppl):S64-S82
- Baron R, 2006. Anatomy and ultrastructure of bone histogenesis, growth and remodeling. <http://www.endotext.org>. akses : 20 maret 2013
- Baylink DJ, Jennings JC, Mohan S. Calcium and Bone Homeostasis and Changes with Aging. In: Hazzard WR et al. editors. *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology*, 4th ed. New York: International Edition McGraw-Hill. 1999; 1041-1056.
- Cohen S, Burns CR. *Pathways of the pulp*, 8th ed. California Mosby, 2002: 203, 690, 692, 693, 696
- Colic Cohen. TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induce alveolar bone resorption. *Journal Immunology*, 2009: 177; 8296-8300
- Colic M, Gazivoda D, Vucevic D, Vasilijic S, Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesion. *Mol.Immunol*. 2009, 47:101-113.
- Coon D, Gulati A, Cowan C, He J. The role of Cyclooxygenase-2(COX-2) in Inflammatory Bone Resorption. *JOE*. 2007;35(4):432-436.
- Craig Baumgartner. Microbiologic aspect of endodontic infections. *CDA Journal*. 2004 (32):6
- Dana T. Graves, Rayyan A. Kayal, Thomas Oates, Gustavo P. Garlet. Osteoimmunology in the Oral Cavity (Periodontal Disease, Lesions of Endodontic Origin and Orthodontic Tooth Movement). *Osteoimmunology* 2011 chapter 15,411-41
- Dana TG, Thomas Oates and Gustavo PG. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of Oral Microbiology* 2011, 3: 5304

- Daniel WW. Biostatistic: a foundation for analysis in the health science. 5th Ed., Canada. John Wiley Sons, Inc. 1991
- Deftos, 2002. Calcium and Phosphate Homeostasis. <http://www.endotext.org> akses: 19 Desember 2014
- Dumitrescu, Alexandrina L. Histological comparison of periodontal inflammatory changes in two models of experimental periodontitis in the rat: a pilot study
- Elizabeth AF. Investigations of Mechanisms Involved in LPS-Stimulated Osteoclastogenesis. Digital Commons @ University of Connecticut. 2007, paper 155. <http://digitalcommons.uconn.edu/sodm> master
- Estrela C., Sydney GB., Bammann LL., Felipe Junior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995;6(2):85-90.
- Estrela C and R. Holland. Calcium hydroxide: study base on scientific evidences. *J Appl Oral Sci* 2003; 11(4):269-82
- Faccio R, Choi Y, Teitelbaum SL, Takayanagi H. The Osteoclasts : The Pioneer of Osteoimmunology in Osteoimmunology 1st ed . 2011; Elsevier Inc. London UK. 141- 185.
- Fan Rong, Sun Bin, Zhang Cheng-fei, Lu Ya-lin, et al. Original article: Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. *Chin Med J* 2011;124(14):2162-2166
- Fouad Ashraf F. Endodontic Microbiology, 1st ed. Wiley-Blackwell, Baltimore USA. 2009: 40-64
- Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 25–31.
- F.V.Vier and J.A.P Figueiredo. Post-Graduate Program of Dentistry, ULBRA, Canoas, Brazil. Prevalence of different periapical lesions associated with human teeth and their correlation with the presence and extension of apical external root resorption, 2005.
- Gandolfi M.G., A new method for evaluating the difussion of Ca²⁺ and OH⁻ ions through coronal dentin into the pulp. *Iranian Endodontic Journal* 2012;7(4): 189-197
- G N Belibasakis, D K Rechenberg, M Zehnder. The receptor activator of NF- κβ ligand-osteoprotegerin system in pulpal and periapical disease. *International Endodontic Journal*, 2013; 46(2):99-111
- George A, Evans CA: Detection of root resorption using dentin and bone markers. *Orthod Craniofac Res* 2009;12:229–235
- Georgios NB, Andre M, Bernhard G, Nagihan Bostanci. Oral biofilm challenge regulates the RANKL-OPG system in periodontal ligament and dental pulp cells. *Microbial Pathogenesis* 50 2011: 6-11

- Grossman LI, Oliet S, Del Rio CE. Ilmu Endodontik dalam Praktek Edisi 11 Jakarta EGC 1998: 196, 221, 248-9, 264, 284
- Guimaraez NL, Otoch HM, Andrade LC. Microbiological evaluation of infected root canals and their correlation with pain. Original Research Article RSBO. 2012 Jan-Mar;9(1):31-7D
- Indahyani ED, Santoso A, Utoro T, HNE Marsetyawan. Pengaruh induksi lipopolisakarida terhadap osteopontin tulang alveolaris tikus pada masa erupsi gigi. Indonesian Journal of Dentistry: Jakarta, 2007. Ed 14(1): 2-7.
- Indre Graunaite, Greta Lodiene, Vita Maciulskiene. Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. J Oral Maxillofac Res 2011 (Oct-Dec);2(4):e1
- Ingle JI, Backland LK, Baumgartner J Craig. Endodontic. 6th ed. People Medical Publishing House. 2008: 151-221, 343-375, 494-519
- Kovacevic Maja, Tomislav Tamarut, Nives Jonjic, Kovacevic Miljenko. The transition from pulpitis to periapical periodontitis in dogs' teeth. Aust Endod J 2008; 34: 12–18
- Lemaire Vincent, Tobin FL, et al. Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling Journal of Theoretical Biology 229 (2004) 293–309
- Leonardo MR, Silva LAB, Leonardo RT. Tratamento de canal radicular em sessão única: crença vs. ciência. In: Feller, Gorab R. Atualização na Clínica Odontológica. Sao Paulo: Artes Medicas; 2000. p. 29–57.
- Leonardo MR., Kernandez Maria EFT., Silva LAB., Tanomaru-Filho M. Effect of calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(5):680-5.
- Leonardo MR., Silveira FF., Silva LAB., Tanomaru-Filho M., Utrilla LS. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. *Braz Dent J* 2002;13(1):17-22.
- Lorenzo J, Horowitz M and Choi Y. Osteoimmunology: Interactions of the Bone and Immune System. *Endocrine Rev.* 2008 ;29(4): 403-440.
- L.R.G. Fava and W.P. Saunders. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications (review). *International Endodontic Journal*, 1999; 32: 257±282
- Maciel K.F. et al Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *International Endodontic Journal*. 2012;45:354-62.
- Mackie EJ. Osteoblasts : novel roles in orchestration of skeletal architecture.; *IJBCB*. 2003 ; 35(2):1301-1305.
- Manolagas SC and Jilka RL. Bone marrow, Cytokines and Bone Remodeling. Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis. *The new England Journal of Medicine*. 1995; 332(5):305-310.

- Manolagas SC.. Birth and Dead of Bone Cells: Basic Regulatory Mecanisms and Implication for the Pathophysiology and treatment of Osteoporosis. The New England Journal of Medicine. 2000; 332 (5):305-310.
- Marcus T. Yan. The management of periapical lesions in endodontically treated teeth. AustEndod J 2006; 32: 2–15
- Marcelo J.B. Silva, Mikihiro Kajiya, Emad Al Shwaimi, Hajime Sasaki, et al. Bacteria-reactive Immune Response May Induce RANKL-expressing T Cells in the Mouse Periapical Bone Loss Lesion. J Endod 2012;38:346–350
- Murray RK, Hormone action and sinyal transduction in Harpers illustrated. Biochemistry Mc Grow Hill 2003: 456-73
- Nagihan Bostanci, Buket Saygan, Gulnur Emingil, Gul Atilla and Georgios N. Belibasakis.Effect of periodontal treatment on receptor activator of NF-kB ligand and osteoprotegerin levels and relative ratio in gingival crevicular fluid. J ClinPeriodontol 2011; 38: 428–433
- Nair, PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.2004;15(6) 348-381
- Nobuo Okahashi, Toshihiko Koga, et al. Immunobiological Properties of Lipopolysaccharides Isolated from *Fusobacterium nucleatum* and *F. necrophom*. Journal of General Microbiology (1988): 134, 1707-15
- Nobuyuki Kawashima, Noriyuki Suzuki, Guangyan Yang, Chie Ohi. Kinetics of RANKL, RANK and OPGexpressions in experimentally induced rat periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod 2007;103:707-11
- Philipp J. Thurner, Carol G. Chen, Sophilonova-Martin., et al. Osteopontin deficiency increases bone fragility but preserves bone mass. J Bone.2010.02.014; 1564-1573
- P. Stashenko, R. Teles and R. D'Souza. Periapical Inflammatory Responses and Their Modulation.Critical Reviews in Oral Biology & Medicine 1998 9: 498G
- P. Stashenko et al., 2007. Th1 Immune Response Promotes Severe Bone resorption Caused by *Porphyromonas gingivalis*. American Journal of Pathology.170: 203-213
- Rajendra P. Settem, Ahmed Taher El-Hassan, et al. *Fusobacterium nucleatum* and *Tannerella forsythia* induce synergistic alveolar bone loss in a mouse periodontitis model. *Infect. Immun.* July 2012 vol. 80 no. 7: 2436-43
- R Vernal, Adezerega, N Dutzan, A Chaparro. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. Oral Diseases (2006) 12, 283–289
- Renato Menezes, ClóvisMonteiro Bramante, Katiúcia Batista da Silva Paiva, Ariadne Letra, et al. Receptor activator NFκβ-ligand and osteoprotegerin

- protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:404-9
- Renato Menezes, Thiago PG, Ana Paula FT, Carlos ER. The potential role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis. *J Endod*. 2008 December;34(12):1480-84
- Renato Menezes, Thiago PG, Ariadne L, Clóvis MB, et al. Differential patterns of RANKL/OPG expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. *J Endod*. 2008 August ; 34(8): 932–938
- Robbins and Cotran. *Pathologic Basis of Disease*. 8th ed. Elsevier Inc : New York. 2011: 233-4;265-8
- Robey P.G, Gronthos S, Shi S, Brahim J, Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Rest*. 2001; 81(8):531-5.
- Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone and remodelling annual. *Reviews Biomed Eng* 8: 455-98
- Ruslan BO. *Imunologi Oral: kelainan di dalam rongga mulut*. Jakarta. Balai penerbit FK UI. 2002: 139-51
- Sandrine Theoleyre, Yohann Wittrant, Steeve Kwan Tat, Yannick Fortun, et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15 (2004) 457–475
- Shanon Patel, Domenico Ricucci, Conor Durak, and Franklin Tay. Internal Root Resorption: A Review. *JOE* — Volume 36, Number 7, July 2010
- Sharefa Al-Asfour. *Alteration of Biological Properties of Bacterial Lipids by Calcium Hydroxide Treatment*. A thesis At the University of Connecticut 2013, p: 1-21
- Shuang Zhang, et al. Identification of dominant pathogens in periapical lesions associated with persistent apical periodontitis. *The Chinese Journal of Dental Research* vol.13 no.2, 2010
- Silveira CFM., Cunha RS., Fontana CE., Martin AS., Gomes BPFA., Motta RHL., Bueno CES. Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. *Eur J Dent*. 2011;5(1):1-7.
- Silva LAB., Nelson-Filho P., Leonardo MR., Rossi MA., Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *JOE* 2002;28(2):94-9.
- Siqueira JF Jr and Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections : Partz-Redefining the endodontic microbiota. *J Endod* 2005. 31 : 488-453.
- Souza Carlos AS., TelesRP., Souto R., Chaves MAE., Colombo APV. Endodontic therapy associated with calcium hydroxide as an intracanal dressing: microbiologic evaluation by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. *JOE* 2005;31(2):79-83.

- Sudhir P. Sase, Jayashree V.Ganu, Nitin Nagane. Osteopontin: A Novel Protein Molecule. Indian Medical Gazette February 2012: 62-66
- Susan R Rittling et al. Protective role of osteopontin in endodontic infection. Immunology. 2010 January; 129(1): 105–114.
- Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. Nat Rev Imm. 2007. 7 : 292-302
- TA Silva, GP Garlet, SY Fukada, JS Silva and FQ Cunha. Chemokines in Oral Inflammatory Diseases: Apical Periodontitis and Periodontal Disease. J Dent Res 2007 86: 306
- Thomas S.B, Al Kandari A.R, Abdul Rahem A.A. healing of large periapical lesions following calcium hydroxide endodontic therapy: two case reports and review of literature. Endodontology, 2000 Vol.12
- Torabinejad M, Walton RE :Endodontics - principles and practice, 4th edition, Saunders Elsevier Inc., 2009
- Torneck CD, Torabinejad M. Biologi jaringan pulpa dan jaringan sekitar akar. In: Sumawinata N, editor. Prinsip dan Praktik Ilmu Endodonsi. Jakarta EGC: 11, 12, 18-23
- Trownbridge HO, Kim S Suda H. Structure and function of dentin and pulp complex. In: Cohen S and Burns RC, editors. Pathways of the Pulp, 8^{ed}. 2002. St. Louis: Mosby Inc. 411-447
- Williams BL, McCann GF and Schoenknecht FD. Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. J. Clin. Microbiol. 1993, 18(4):770
- Xiaolei Zhang, and Bin Peng. Immunolocalization of Receptor Activator of NF Kappa B Ligand in Rat Periapical Lesions. JOE—Volume 31, Number 8, August 2005
- Y.Wittrant, S.Theoleyre, C.Chipoy, M. Padrines, et al. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumours and associated osteolysis. Biochimica et Biophysica Acta 1704 (2004) 49- 57
- Z. Mohammadi and P.M.H. Dummer. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. International Endodontic Journal 2011, 44, 697-730