

EKSPRESI *Interleukin-1 (IL-1)* PADA PERIAPIKAL AKIBAT INDUKSI BAKTERI *Enterococcus faecalis*

(PENELITIAN EKSPERIMENTAL PADA TIKUS WISTAR)

***Interleukin-1 (IL-1)* EXPRESSION IN PERIAPICAL DUE TO *Enterococcus faecalis* INDUCTION**

Yuliana Dwiwahyu Suryandari*, Ketut Suardita **, M. Mudjiono **, Tamara Yuanita**

*Mahasiswa Spesialis Departemen Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

** Departemen Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

ABSTRACT

Background. Root canal treatment is a main role in decreasing infection from root canal and pulp. The main cause of periapical damage mostly are bacteria. *E. faecalis* is a bacteria that is found as an etiology of endodontic treatment failure. Cell wall of this bacteria is containing Lipoteichoic acid (LTA). LTA can penetrate into the periradicular tissue, act as endotoxin in host and cause periradicular inflammation and destruction. It occurs due to the capability of IL-1. IL-1 is the proinflammation cytokine that is the key of host response bacteria invasion and tissue damage. Also IL-1 could cause some indirectly tissue damage through the activation of MMPs. MMPs to stop the collagen formation. **Purpose.** The aim of this study is to know about the expression of IL-1 during the periapical tissue damage due to induction of *E. faecalis*. **Method.** This study used laboratory experimental with the post test only control group design. A total of 54 male rats were randomly divided into 2 main groups, which each main group had 3 subgroups. Group A (control) : every tooth was induced only by sterile BHIb. Group A had 3 subgroups (A Control day 3, 10, and 21), group B : every tooth was induced by 10 µl BHI-b *E. faecalis* ATCC212(10⁶ CFU), it was contained 3 sub groups (B day 3, 10, and 21). The animals were sacrificed based on their days scheduled group and prepared for histological examination of tissue damage, then we did the immunohistochemistry followed by calculation on the light microscope. **Result.** The analysis revealed that the expression of IL-1 increased significantly in group B when *E. faecalis* was induced. **Conclusion.** From this study we know that the expression of IL-1 is increasing during the periapical tissue damage that induced by *E. faecalis*.

Keywords : IL-1, *E. faecalis*, tissue damage

PENDAHULUAN

Dalam bidang kedokteran gigi, perawatan saluran akar memegang peranan penting untuk menurunkan jumlah penyakit pulpa dan periapikal.¹ Perawatan saluran akar merupakan suatu rangkaian tindakan perawatan pada pulpa yang terinfeksi dengan tujuan untuk mengeliminasi infeksi dan melindungi gigi dari dekontaminasi invasi mikroba selanjutnya.² Kegagalan pada perawatan

saluran akar berhubungan dengan peradangan pada daerah apical.³

Dalam kasus infeksi endodontik pada gigi yang telah mengalami perawatan saluran akar, didapatkan bahwa dari 30 kasus yang ada ternyata 20 kasus disebabkan oleh karena adanya bakteri *E. faecalis*.⁴ Pada pemeriksaan PCR, *E. faecalis* ditemukan di saluran akar yang telah dilakukan obturasi dan mengalami kelainan periapikal sebesar 77%.⁵ *E. faecalis* merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit periapikal dengan

faktor virulensi yang besar. Faktor virulen penting yang dimiliki *E.faecalis* adalah *Lipoteichoic acid* (LTA). LTA adalah unsur pokok utama dari *outer envelope* bakteri gram positif. LTA dapat dikenali oleh molekul *signaling* spesifik pada permukaan sel host yang disebut *Toll-like receptors-2* (TLR-2) yang menghasilkan respon imun.⁴

Adanya hubungan antara pulpa dengan daerah periapikal akan menyebabkan bakteri yang tertinggal dalam saluran akar menjadi penyebab proses inflamasi pada jaringan periapikal, dan memproduksi berbagai sitokin proinflamasi yaitu TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8.⁶ IL-1 adalah sitokin proinflamasi yang merupakan kunci dari respon tubuh terhadap invasi mikroba, reaksi imunologi dan cedera jaringan.⁷ IL-1 juga merupakan suatu *leukocyte activating factor*.⁸ Selain itu IL-1 juga dapat menyebabkan kerusakan jaringan tetapi tidak secara langsung, melainkan dengan cara IL-1 menstimulasi MMPs. Kemudian MMPs yang berada di dalam jaringan menyebabkan kerusakan jaringan (Dinarello., 2000).⁷

MATERI DAN METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris. Sampel penelitian menggunakan tikus jantan yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dewasa, jantan, umur 8 - 12 minggu, berat badan antara 120 - 150 gram, dengan alasan perubahan berat badan selama penelitian relatif kecil, gigi molar sudah tumbuh sempurna, kondisi fisik sehat. Besar sampel yang digunakan tiap-tiap kelompok adalah sebanyak 9 ekor tikus Wistar sehingga total sampel yang digunakan sebesar 54 ekor tikus Wistar. Tindakan awal yaitu tikus difixir pada papan retraksi rahang kemudian dilakukan tindakan perforasi atap pulpa molar atas dengan menggunakan mata bur no ¼. Tikus yang telah memenuhi persyaratan dilakukan

anastesi via intra peritoneal dengan injeksi ketamin 80 mg/kg dan xylazine 10 mg/kg berat badan.⁹ Setelah itu penutupan kavitas menggunakan resin GIC pasca penetrasi *E.faecalis* ATCC212 sebanyak 10⁶ CFU.

Ada dua kelompok penelitian: Kelompok Perlakuan A. Sebagai kelompok kontrol, dilakukan preparasi gigi hingga terjadi perforasi atap pulpa, pada hewan coba kelompok ini dilakukan injeksi BHIb steril. Kelompok Perlakuan B dilakukan preparasi gigi hingga terjadi perforasi atap pulpa, pada hewan coba kelompok ini dilakukan injeksi 10 μ l BHI-b berisi bakteri *E.faecalis* ATCC212 sebanyak 10⁶ CFU dengan mikropipet. Tiap – tiap kelompok, baik kelompok A maupun B memiliki 3 sub kelompok, yaitu A hari ke 3, 10, dan 21, serta B hari ke 3, 10, dan 21. Lalu hewan coba dikorbankan sesuai dengan kelompok masing-masing harinya, yaitu hari ke 3, 10, dan 21. Tahap selanjutnya yaitu pemotongan jaringan dengan langkah-langkah sebagai berikut, euthanasia pada tikus dilakukan dengan dislokasi servikal, lalu tikus difiksasi pada meja kerja lalu dilakukan dekaputasi serta pemisahan cranium dengan mandibula. Masing-masing potongan rahang difiksasi pada 10% buffer formalin netral selama 24 jam dan didekalsifikasikan pada EDTA 4% selama 30 hari kemudian dilakukan pembuatan sediaan blok parafin. Kemudian dilakukan pembuatan sediaan HPA (preparat) sehingga dapat dilihat adanya kerusakan tulang periapikal. Setelah dipastikan telah terjadi kerusakan maka selanjutnya dilakukan pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi anti IL-1 agar dapat dilihat dengan perbesaran 1000x pada 20 lapang pandang dalam mikroskop cahaya untuk selanjutnya dilakukan perhitungan jumlah sel osteoklas yang mengekspresikan IL-1 di periapikal. Untuk kebutuhan inferensial, maka data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dianalisa dengan uji statistik, yaitu: Uji normalitas untuk melihat apakah mempunyai distribusi yang normal

dilakukan dengan uji Kolmogorov-Smirnov Test, Uji homogenitas untuk melihat homogenitas variant berdasarkan populasi berat badan umurnya dengan uji Levene Test, dan oneway ANNOVA untuk melihat adanya pengaruh induksi *E.faecalis* terhadap perbedaan jumlah sel IL-1 pada antar kelompok kontrol. Data dikatakan tidak ada beda bila $p > 0,05$ dan ada beda bila $p < 0,05$. Sedangkan untuk kelompok perlakuan dilakukan uji *Kruskall Wallis* untuk melihat adanya pengaruh induksi *E.faecalis* terhadap perbedaan jumlah sel IL-1 pada antar kelompok perlakuan. Data dikatakan tidak ada beda bila $p > 0,05$ dan ada beda bila $p < 0,05$. Kemudian dilakukan uji Tukey HSD untuk mengetahui perbedaan masing-masing tiap kelompok. Data dikatakan tidak ada beda bila $p > 0,05$ dan ada beda bila $p < 0,05$. Selanjutnya dilakukan uji Independent T-test untuk mengetahui perbedaan antar 2 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Data dikatakan tidak ada beda bila $p > 0,05$ dan ada beda bila $p < 0,05$.

HASIL DAN DISKUSI

Hasil gambaran imunohistokimia pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tampak ekspresi IL-1 pada daerah periapikal.

Dari hasil penelitian dan analisis penelitian peningkatan jumlah ekspresi IL-1 dan osteokalsin akibat induksi bakteri *E.faecalis* pada periapikal yang dibagi dalam dua kelompok, kelompok kontrol dan kelompok perlakuan induksi didapatkan hasil seperti pada tabel di bawah ini :

Tabel 1. Hasil Rerata Ekspresi IL-1 pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan

Kelompok penelitian	N	Ekspresi IL-1	
		X	SD
K3	9	4,556	1,014
K10	9	10,000	1,581
K21	9	7,333	1,414

P3	9	8,556	1,104
P10	9	17,556	2,297
P21	9	21,667	1,581

Berdasarkan data tersebut dapat dilihat adanya peningkatan ekspresi baik IL-1 bila dibandingkan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan.

Sebelum dilakukan uji analisis antar kelompok penelitian maka dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas terlebih dahulu pada masing-masing kelompok. Uji normalitas pada penelitian ini menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*, dilakukan pula uji homogenitas menggunakan *Levene test*. Hasil penelitian didapatkan hasil uji normalitas *Kolmogorof Smirnof* menunjukkan bahwa data yang didapat pada keseluruhan kelompok $p=0,559$, $p=0,107$, $p=0,578$, $p=0,559$, $p=0,863$, $p=653$ ($p>0,05$) berarti berdistribusi normal. Sedangkan uji homogenitas yang diukur dengan *Levene test* menunjukkan bahwa data yang didapat pada kelompok kontrol $p=0,311$ ($p>0,05$), artinya semua data kelompok kontrol bersifat homogen. Sedangkan untuk kelompok perlakuan data yang didapat $p=0,000$ ($<0,05$), artinya semua data kelompok perlakuan bersifat tidak homogen.

Selanjutnya dilakukan uji oneway ANNOVA untuk mengetahui perbedaan antar kelompok kontrol. Hasil penelitian didapatkan dari uji oneway ANNOVA didapat dari keseluruhan kelompok kontrol 0,000 ($p<0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna antar kelompok. Sedangkan untuk kelompok perlakuan dilakukan uji *Kruskall Wallis* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Hasil penelitian didapatkan dari uji *Kruskall Wallis* didapat dari keseluruhan kelompok perlakuan 0,000 ($p<0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna antar kelompok hasil. Kemudian dilakukan uji

Tukey HSD untuk mengetahui perbedaan masing-masing tiap kelompok.

Tabel 1. Uji Tykey HSD Kelompok Kontrol IL-1

Kelompok	K3	K10	K21
K3	-	0,000	0,001
K10	-	-	0,001
K21	-	-	-

Tabel 2. Tukey HSD Kelompok Perlakuan IL-1

Kelompok	P3	P10	P21
P3	-	0,000	0,000
P10	-	-	0,000
P21	-	-	-

Dari tabel di atas semua nilai $p < 0,05$ sehingga terdapat beda yang signifikan jumlah ekspresi IL-1 antara kelompok kontrol dan antara perlakuan sesuai dengan harinya pada periapikal akibat induksi *E.faecalis*.

Tabel 3. Independent T-tes IL-1 Ekspresi IL-1

IL-1	Kelompok	P
	Kontrol 3	0,000
	Perlakuan 3	
	Kontrol 10	0,000
	Perlakuan 10	
	Kontrol 21	0,000
	Perlakuan 21	

Dari tabel di atas semua nilai $p < 0,05$ sehingga terdapat beda yang signifikan jumlah ekspresi IL-1 antara kelompok kontrol dengan perlakuan sesuai dengan harinya pada periapikal akibat induksi *E.faecalis*.

DISKUSI

Kegagalan perawatan saluran akar dapat menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan periapikal. Invasi bakteri dan kerusakan jaringan periapikal akan diikuti oleh respon imun tubuh. Bakteri dan komponen dinding selnya akan bereaksi dengan monosit (makrofag) dengan sistem sel imun serta fibroblas yang menyebabkan pelepasan sitokin proinflamatori diantaranya IL-1 β and TNF- α . Pelepasan sitokin IL-1 dan TNF- α akan mengakibatkan kerusakan pada jaringan periapikal. Makrofag yang teraktivasi menghasilkan berbagai macam sitokin yang sebagian besar merupakan sitokin proinflamatori (TNF- α dan IL-1) dan kemotaktik (IL-8). TNF- α secara intensif akan mempengaruhi respon lokal vaskular, resorpsi tulang oleh osteoklas dan sebagai mediator yang mendegradasi matriks ekstraselular.⁹

Bakteri yang paling resisten adalah *enterococcus faecalis*. *E.faecalis* dapat bertahan selama perawatan saluran akar karena bakteri ini mempunyai karakteristik *Innate alkalo-tolerant* yang dapat memompa proton sehingga terjadi transportasi kation dan proton ke dalam sel untuk memelihara sitoplasma pada keadaan pH netral.¹⁰ *E.faecalis* masih tetap dapat bertahan hidup meskipun diberikan medikamen kalsium hidroksida. Bakteri *E. faecalis* mempunyai kemampuan menembus 400 μm dalam waktu 2 minggu sedangkan kemampuan penetrasi larutan irrigasi maksimal hanya sekitar 10 μm .⁹

Faktor virulen *E.faecalis* adalah *Lipoteichoic acid* (LTA). LTA merupakan unsur utama dari *outer envelope* bakteri gram positif. LTA dapat dikenali oleh molekul *signaling* spesifik pada permukaan sel *host* yang disebut *Toll-like receptors-2* (TLR-2) yang akan mengaktifkan respon imun. Respon imun terhadap benda asing/antigen terdiri dari beberapa tahapan yang akan terjadi pada

periode hari ke 0-7 dimana terjadi *recognition phase* dan *activation phase*. Tahapan akan berlanjut pada hari 7-14 dimana terjadi *activation phase* dan *effector phase*. Tahapan selanjutnya akan terjadi pada hari 14-30 yaitu fase homeostasis yang merupakan fase perbaikan.¹¹

Respon imun yang terjadi akibat adanya bakteri *E.faecalis* melalui pengenalan LTA oleh TLR-2 akan menghasilkan proses peradangan jaringan periapikal, di mana karena virulensi dari *E.faecalis* yang tinggi maka proses itu berlanjut menjadi suatu kerusakan jaringan periapikal.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui jumlah ekspresi IL-1 pada kelompok kontrol hari ke 3 lebih kecil daripada kelompok kontrol hari ke-10, artinya ada pengaruh terhadap waktu. Hal ini sesuai dengan pola umum peradangan akibat antigen secara umum yaitu pada hari ke 0-3 terjadi *recognition and activation phase*. Sel yang berperan pada fase ini adalah *naive B lymphosit*, *naive T lymphosit*, *antigen presenting cell* yang berfungsi untuk mengenali dan merespon antigen yang masuk lalu menyeleksi dan mengaktifkan sel-sel respon imun agar nantinya dapat bekerja mengeliminasi antigen. Fase ini adalah *innate immunity* yang merupakan baris terdepan perlindungan tubuh.¹¹ Sesuai dengan pola peradangan akibat antigen bahwa pada hari ke 7-14 terjadi *activation and effector phase*. Sel yang berperan adalah *Effector T Lymphosit* dan sel-sel pada *adaptive immunity*. Antibodi dan limfosit T mengeliminasi ekstraseluler dan intraseluler. Fungsi dari *innate immunity* sama dengan *adaptive immunity*, tetapi *adaptive immunity* dapat membantu meningkatkan fungsi dari *innate immunity*. Peningkatan fungsi ini dibuktikan dengan meningkatnya ekspresi IL-1 pada kontrol hari ke-10.¹¹

Kelompok kontrol hari ke-10 lebih besar daripada kelompok kontrol hari ke 21, artinya ada pengaruh waktu terhadap

ekspresi IL-1. Hal ini sesuai dengan pola peradangan yang menunjukkan bahwa di hari 14-30 adalah *effector phase and homeostasis*, sel-sel yang berperan pada fase efektor mulai menurun diikuti oleh kenaikan fase homeostasis. Pada proses ini terjadi suatu apoptosis dimana banyak sel limfosit yang mati.¹¹ Dibuktikan dengan hasil penelitian bahwa ekspresi IL-1 sudah mengalami penurunan sebagai proses homeostasis.

Pada kelompok perlakuan diketahui jumlah ekspresi IL-1 pada kelompok perlakuan hari ke-3 lebih kecil daripada kelompok perlakuan hari ke-10, dan kelompok kontrol hari ke-10 lebih kecil daripada kelompok perlakuan hari ke-21, pada kelompok perlakuan ini bakteri *E.faecalis* yang mempengaruhi. Bakteri memegang peranan terbesar pada kegagalan perawatan saluran akar yang disebabkan oleh kerusakan periapikal.¹² *E. faecalis* adalah bakteri gram positif yang berperan dalam infeksi endodontik. Bakteri ini diketahui merupakan bakteri yang masuk ke dalam tubuli dentin dan merupakan salah satu bakteri etiologi kegagalan perawatan saluran akar. *E. faecalis* merupakan spesies terbanyak yang ditemukan pada kasus infeksi endodontik yang persisten pada gigi yang telah dirawat perawatan saluran akar.⁴ Bakteri ini dapat bertahan hidup setelah perawatan saluran akar.⁵ *E. faecalis* dapat bertahan hidup dalam jangka waktu yang lama walau dalam kondisi nutrisi yang terbatas melalui hyaluronidase yang dapat menyediakan nutrisi berupa disakarida hasil degradasi yang ditransport dan dimetabolisme secara intraseluler oleh bakteri dan serum yang berada pada cairan tubulus dentin.¹⁰

IL-1 adalah sitokin proinflamasi yang memegang peranan penting pada respon tubuh terhadap adanya invasi bakteri, jejas maupun respon imun. Sumber utama dari IL-1 adalah *mononuclear phagocytes* yang teraktivasi melalui produk bakteri seperti LTA. Selain itu IL-1 terdapat pada sel dendrit, sel

epitel, sel endotel, sel B, fibroblast dan limfosit. IL-1 memiliki fungsi yang sama dengan TNF α adalah sebagai mediator respon inflamasi terhadap infeksi. IL-1 dengan TNF α juga memiliki peran pada *innate immunity* dan inflamasi. IL-1 merupakan suatu *leukocyte activating factor*.⁸ IL-1 tidak secara langsung mengaktifkan leukosit, tetapi dengan cara menyebabkan fagositosis mononuklear dan sel endotel mensintesis kemokin, sehingga mengaktifkan leukosit.¹¹ IL-1 mengaktifkan kerja leukosit dengan cara meningkatkan adhesi leukosit ke dinding endotel. Leukosit merupakan sel darah putih yang terdiri dari 2 jenis yaitu yang memiliki granulosit diantaranya basofil, eosinofil, neutrofil, dan adapun yang tidak memiliki granulosit diantaranya limfosit dan monosit. IL-1 juga menstimulasi limfosit serta neutrofil.¹³ Stimulasi neutrofil ini akan bekerja dengan cara memfagositosis bakteri patogen.

IL-1 tidak bekerja sendiri dalam kerusakan jaringan, IL-1 bersama dengan TNF α . Pelepasan TNF- α bersama IL-1 akan meningkatkan produksi MMP sehingga terjadi pelepasan matrix metalloproteinase (MMPs).¹⁴ MMPs merupakan enzim proteinase utama yang menyebabkan destruksi jaringan periapikal dengan mendegradasi molekul matriks ekstraseluler termasuk kolagen. MMPs merupakan endopeptidase yang merupakan mediator penting terhadap kerusakan jaringan pada inflamasi yang memecah sebagian besar matriks ekstraseluler dan membran basalis.⁷ Hal ini akan menyebabkan kerusakan jaringan periapikal.

KESIMPULAN

Dengan demikian, dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Terjadi peningkatan ekspresi IL-1 pada hari ke 3, 10, dan 21 setelah induksi bakteri *Enterococcus faecalis* dan Ekspresi IL-1 yang diinduksi bakteri *E.faecalis* yang tertinggi terjadi pada hari ke-21.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gomes, Vivaqua; Filho, Gurgel;Gomes, B; Ferraz C;Zaia, A; Filho Souza. Recovery of *Enterococcus faecalis* After Single or Multiple Visit Root Canal Treatments Carried Out in Infected Teeth Ex Vivo. International Endodontic Journal 2005; 38(10): 348- 453.
2. Cohen S, Hangreaves KM. Cohen Pathways of the Pulp. 10th ed, St Louis Missouri. Mosby Inc; 2011. p. 529-58
3. Robbins. Cotran. Dasar Patologis Penyakit.Ed 7 Bahasa Indonesia. Jakarta; EGC; 2010. h. 56-7
4. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC and Souza EL. Microorganism from Canals of Root Filled Teeth with Periapical Lesions. Int Endod J 2003; 36 (1): 1-11
5. Rocas IN, Siquera JF Jr, Aboim MC, Rosado AS. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis os Bacterial Communities Associated with Failed Endodontic Treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004; 98: 741-9.
6. Lee JK, Baik JE,, Yun CH, Lee K, Han, SH, Lee WC, DDS, Bae KS, DDS, Baik SH, Yoon L, Won JS, dan Kee YK. Chlorhexidine Gluconate Attenuates the Ability of Lipoteichoic Acid from *Enterococcus faecalis* to Stimulate Toll-like Receptor 2. Journal of Endodontics 2009; 35(2): 212-15.
7. Dinarello CA. A Biology of Interleukin-1. FASEB J 2000; 2: 108-15
8. Mooduto L. Respon Imun pada Inflamasi Jaringan Pulpa. Surabaya. Revka Petra Media; 2012. h. 77
9. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ dan Owatz CB. *Enterococcus*

- Faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. Journal of Endodontics 2006; 32: 93-8.
10. Chaves DPL. Gram-Positive Organisms in Endodontic Infections. Endodontic Topics 2004; 9 : 79-96
 11. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., dan Pober, J.S. Cellular and Molecular Immunology. Edisi ke-6. Philadelphia: WB Saunders Company; 2010. Hal 12-6
 12. Craig B. Microbiologic Aspects of Endodontic Infection. CDA J 2004; 32: 6-11
 13. Nair PN. On The Causes of Persistent Apical Periodontitis: A Review. International Endodontic Journal 2008; 39(4): 249-54.
 14. Grigoradou M. Koutayas S. Madianos P. Strub J. Interleukin as a Genetic Marker or Periodontitis : Review of the Literature 2

