

Email : 8-3-2020

Nanik Zubaidah nanik-z@fkg.unair.ac.id

Revisi naskah journal kez

To: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga <dental_journal@fkg.unair.ac.id>

Sy kirim naskah revisi ke 2 ...mhn diterima...trmkasih

Wass

Drg Nanik Zubaidah

Efektifitas Lama Penyinaran LED Pada Photodynamic Therapy Terhadap Penurunan Jumlah Bakteri *Enterococcus Faecalis*

ABSTRAK

Latar belakang: Keberhasilan dari perawatan saluran akar adalah dapat mengeliminasi bakteri patogen dari saluran akar yang terinfeksi. Bakteri yang paling sering dapat menyebabkan infeksi saluran akar adalah *Enterococcus faecalis* karena bakteri tersebut resisten terhadap medikamen dan irigasi saluran akar. Photodynamic therapy (PDT) merupakan suatu metode desinfeksi saluran akar menggunakan kombinasi cairan fotosensitizer dan sinar aktivasi untuk mengeliminasi bakteri pada saluran akar. Lama penyinaran PDT dapat mempengaruhi produksi singlet oksigen dan ROS (Reactive Oxygen Species) untuk **mengeliminasi** bakteri *Enterococcus faecalis*. **Tujuan:** Untuk menganalisis perbedaan lama penyinaran photodynamic therapy terhadap jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* **Metode:** Penelitian ini menggunakan kultur bakteri *Enterococcus faecalis* yang terbagi dalam 7 kelompok tabung eppendorf. Kelompok I sebagai kelompok kontrol, kelompok II, III, IV, V, VI dan VII diberi fotosensitizer Toluidine Blue O (TBO) dan diberi perbedaan lama penyinaran 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 detik. Setelah diinkubasi, jumlah bakteri dihitung dengan Quebec Colony Counter dan dianalisis dengan Kruskal Wallis test dan Mann Whitney test **dengan $p < 0,05$** . **Hasil:** Terdapat perbedaan signifikan (**$p < 0,002$**) antara jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* pada tiap kelompok perlakuan. Lama penyinaran PDT yang lebih lama (Kelompok VI dan VII) menunjukkan jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* yang lebih sedikit. **Kesimpulan:** Semakin lama penyinaran PDT maka semakin sedikit jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*. Lama penyinaran 50 detik merupakan waktu yang paling efektif untuk membunuh seluruh jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*. **Keywords:** photodynamic therapy, *Enterococcus faecalis*, irradiation time

PENDAHULUAN

Infeksi endodontik terjadi akibat adanya invasi beberapa bakteri pada saluran akar. *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri patogen yang paling banyak ditemukan pada saluran akar (4-40%) dan menyebabkan 20-70% kegagalan perawatan endodontik.^{1,2} Pada beberapa penelitian, *Enterococcus faecalis* banyak ditemukan di dalam saluran akar yang telah dilakukan perawatan saluran akar, karena bakteri tersebut resisten terhadap beberapa medikamen dan bahan irigasi antimikroba selama perawatan saluran akar.^{3, 4, 5} Di dalam tubulus dentin, *Enterococcus faecalis* dapat bertahan dari medikamen intrakanal Ca(OH)_2 (kalsium hidroksida) sampai lebih dari 10 hari.⁶

Eliminasi bakteri patogen yang ada dalam saluran akar dapat mempengaruhi keberhasilan perawatan saluran akar. Struktur dan bentuk saluran akar yang kompleks merupakan masalah utama dalam pembersihan saluran akar untuk mengeliminasi bakteri patogen tersebut. Bakteri yang tertinggal di dalam saluran akar dapat berpenetrasi pada tubuli dentin akar hingga kedalaman 1000 μm , sedangkan bahan desinfeksi irigasi hanya mencapai kedalaman 100 μm .^{4, 5, 7}

Pada beberapa dekade terakhir dikembangkan *photodynamic therapy* (PDT), yaitu metode desinfeksi menggunakan sinar cahaya (*light activated disinfection*) dengan panjang gelombang tertentu, yang terdiri dari dua komponen yaitu sumber sinar cahaya berupa LED (*Light Emitting Diode*) atau laser diode sebagai fotoaktivasi, dan cairan fotosensitizer yang dapat menyebabkan fotoaktivasi pada bakteri. Molekul cairan fotosensitizer tersebut diaktifkan dengan sumber cahaya sehingga reaksi tersebut menghasilkan singlet oksigen reaktif yang memiliki efek sitotoksik dan dapat merusak struktur sel bakteri. Penggunaan PDT setelah preparasi mekanis dan irigasi secara kimiawi dapat mengeliminasi bakteri patogen dalam saluran akar secara efektif. Sinar cahaya PDT tersebut dapat menjangkau area saluran akar yang sulit dijangkau dengan irigasi konvensional karena sinar ini dapat mencapai kedalaman 0,5 cm – 1,5 cm tubuli dentin akar. Selain itu sinar tersebut tidak memiliki kandungan toksik dan memiliki derajat selektivitas yang tinggi untuk membunuh bakteri melalui reaksi dengan cairan fotosensitizer dan oksigen tanpa merusak sel host. Pada studi *in vivo* dilaporkan bahwa PDT efektif mengeliminasi bakteri yang resisten terhadap beberapa jenis medikamen. Berdasarkan hasil penelitian yang menggunakan PDT berupa Fotosan dapat membunuh bakteri gram positif dan negatif, seperti *Streptococcus mutans* dan *Enterococcus faecalis*.^{8, 9}

Fotosan merupakan *photodynamic therapy* yang menggunakan sinar merah LED (*Light Emitting Diode*) dengan panjang gelombang 630 nm serta cairan fotosensitizer *Toluidine Blue O* (TBO). Menurut protokol penggunaan fotosan untuk perawatan endodontik, fotosensitizer dimasukkan ke dalam saluran akar selama 60 detik agar cairan tersebut kontak dengan dinding saluran akar. Kemudian endodontik tip dari alat tersebut dimasukkan ke dalam saluran akar dan disinari selama 30 detik. Hal ini sesuai dengan penelitian Schlafer yang menunjukkan bahwa penggunaan fotosan selama 30 detik dapat menurunkan jumlah mikroorganisme patogen penyebab infeksi endodontik (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*,

Fusobacterium nucleatum, *Streptococcus intermedius*) dibandingkan dengan 10 detik dan 20 detik secara in vitro dan ex vivo. Namun dari penelitian Poggio didapatkan penurunan jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sanguin* pada waktu penyinaran yang lebih lama yaitu 90 detik. Selain itu dari penelitian Xhevdet *et al* (2014) mengenai PDT didapatkan hasil waktu penyinaran pada bakteri *Enterococcus faecalis* selama 5 menit memiliki efek yang lebih besar dibandingkan penyinaran selama 1 menit dan 3 menit namun tidak memiliki perbedaan yang signifikan antara lama penyinaran dengan berkurangnya jumlah bakteri.^{4, 10, 11}

Keefektifan PDT tergantung pada tingkat kekuatan, durasi, penyerapan dari sinar pada jaringan, geometri dari saluran akar dan jarak ujung alat ke sel target. Fenomena penyerapan sinar oleh fotosensitizer merupakan proses fotofisika yang berlangsung saat molekul fotosensitizer yang memiliki konfigurasi elektron pada keadaan stabil (*ground state*) menyerap cahaya foton. Setelah menyerap cahaya, konfigurasi elektron molekul berubah menjadi tidak stabil (*excited state*). Dari *excited state*, elektron molekul fotosensitizer dapat kembali menjadi *ground state* apabila kehilangan energi atau menjadi *triplet state* apabila terus mendapatkan energi yang cukup. Pada *triplet state* ini merupakan keadaan yang reaktif, namun dalam keadaan ini terjadi interaksi secara kimiawi antara elektron dari molekul dengan oksigen yang memiliki konfigurasi elektron pada keadaan stabil. Karena adanya interaksi tersebut menyebabkan konfigurasi elektron dari molekul oksigen berada pada keadaan tereksitasi (tidak stabil). Oksigen tereksitasi cenderung akan berusaha ke kondisi elektron yang stabil, sehingga oksigen ini akan melakukan interaksi dengan sistem biologi disekitarnya. Interaksi yang terjadi antara oksigen tereksitasi dan sistem biologi seperti sel bakteri akan merusak sistem dan struktur sel tersebut. Hal tersebut menunjukkan pentingnya lama penyinaran untuk menghasilkan oksigen reaktif sehingga dapat menurunkan jumlah bakteri.^{12, 13, 14}

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perbedaan lama penyinaran *photodynamic therapy* (PDT) menggunakan sinar merah LED dan cairan fotosensitizer *Toluidine Blue O* (TBO) terhadap jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*.

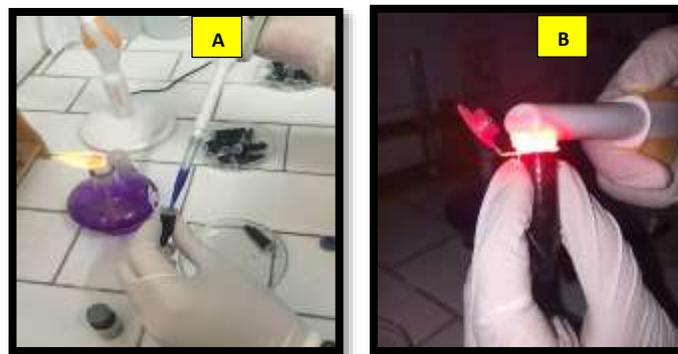
BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Sampel penelitian yang dipakai pada penelitian ini adalah bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Penentuan jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini menggunakan rumus Lemeshow *et al* 1990, didapatkan jumlah total sampel sebanyak 42. Sampel dibagi menjadi 7 kelompok, kelompok I (KI-K): merupakan kelompok kontrol tanpa penyinaran, kelompok II (KII-10): diberi penyinaran dengan PDT selama 10 detik, kelompok III (KIII-20): 20 detik, kelompok IV (KIV-30): 30 detik, kelompok V (KV-40): 40 detik, kelompok VI (KVI-50): 50 detik, kelompok VII (KVII-60): 60 detik.

Pembuatan kultur bakteri *Enterococcus faecalis* dilakukan dengan pengambilan sediaan kultur bakteri *Enterococcus faecalis* dengan kawat ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi *Brain Heart Infusion* (BHI) broth I. Kemudian diaduk dan diinkubasi (37°C) dalam inkubator (48 jam) dengan suasana anaerob (Forbes *et al.*, 2002). Kemudian dari tabung BHI broth I tersebut diambil 0,5 ml dengan mikropipet untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi BHI broth II dan disetarakan dengan skala Mc Farland untuk mendapatkan suspensi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

Pembuatan sampel didapatkan dari tabung reaksi suspensi bakteri diambil 0,5 ml dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam masing – masing 42 tabung eppendorf. Tabung eppendorf tersebut sudah dilapisi dengan lakban hitam¹⁵ agar pada saat penyinaran, sinar PDT tidak diteruskan keluar dinding tabung. Sampel sebanyak 42 tabung eppendorf tersebut dikelompokkan menjadi 7 kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 6 buah tabung eppendorf.

Kelompok I merupakan kelompok kontrol (tanpa fotosensitizer dan tanpa penyinaran), hanya berisi sampel bakteri *Enterococcus faecalis*. Kelompok II diberi fotosensitizer berupa cairan Toluidine Blue O (TBO) sebanyak 0,5 ml dan ditunggu selama 60 detik, kemudian dilakukan penyinaran dengan sinar LED selama 10 detik. Untuk selanjutnya, kelompok III sampai kelompok VII diberi perlakuan seperti kelompok II dengan urutan lama penyinaran dengan sinar LED selama 20 detik, 30 detik, 40 detik, 50 detik dan 60 detik.^{10, 11}



Gambar 1 (a) Pemberian 0,5 ml Fotosensitizer TBO ke Dalam Tabung Eppendorf yang Berisi 0,5 ml Bakteri *Enterococcus faecalis* (b) Penyinaran dengan sinar LED Sesuai dengan Kelompok Perlakuan

Setelah semua kelompok dilakukan penyinaran, masing – masing tabung eppendorf (kelompok I – VII) diambil 0,1 ml dengan mikropipet dan ditanam di petridish berisi nutrisi agar. Petridish berisi media nutrisi agar tersebut diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C dalam suasana anaerob.

Setelah diinkubasi, jumlah koloni bakteri pada petridish dihitung menggunakan *iuebec Colony Counter* dengan metode CFU (*Colony Forming Unit*) dan digunakan sebagai data setelah penyinaran untuk dianalisis data.⁹

HASIL

Dari penghitungan statistik, didapatkan hasil rata-rata dan standar deviasi jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* setelah dilakukan penyinaran seperti tabel 1.

Tabel 1. Rerata Dan Standar Deviasi Jumlah Koloni Bakteri *Enterococcus faecalis* Setelah Dilakukan Penyinaran

KELOMPOK	N	Mean	SD
KI K	6	116.67	4.67
KII 10	6	33.67	4.32
KIII 20	6	23.33	3.72
KIV 30	6	16.00	2.19
KV 40	6	12.50	2.73
KVI 50	6	.00	.000
KVII 60	6	.00	.000
Rata - rata	42	28.88	38.09

Dari hasil rerata setelah penyinaran dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan menunjukkan nilai $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa semua kelompok perhitungan mempunyai distribusi data yang normal. Kemudian data tersebut dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan uji statistik *Levene Test* dan didapatkan $p < 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa data pada ketujuh kelompok tidak mempunyai varians yang homogen.

Setelah dilakukan uji normalitas dan homogenitas maka selanjutnya digunakan *Kruskal Wallis Test* untuk mengetahui perbedaan secara keseluruhan kelompok. Dari hasil uji didapatkan nilai $p < 0,05$. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara jumlah koloni bakteri *Enterococcus Faecalis* pada seluruh kelompok perlakuan. Pada uji *Mann Whitney* memiliki syarat $p < 0,05$ untuk menunjukkan ada perbedaan bermakna pada tiap kelompok. Pada tabel tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara kelompok I (kontrol) dengan kelompok perlakuan yang lain (kelompok II, III, IV, V, VI, VII).

Tabel 2 Hasil Uji *Mann Whitney*

KELOMPOK	KI K	KII 10	KIII 20	KIV 30	KV 40	KVI 50	KVII 60
KI K	-	0.004*	0.004*	0.004*	0.004*	0.002*	0.002*

KII 10	-	-	0.004*	0.004*	0.004*	0.002*	0.002*
KIII 20	-	-	-	0.004*	0.004*	0.002*	0.002*
KIV 30	-	-	-	-	0.044*	0.002*	0.002*
KV 40	-	-	-	-	-	0.002*	0.002*
KVI 50	-	-	-	-	-	-	1.000
KVII 60	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : *) ada perbedaan bermakna

Pada tabel tersebut sebagian besar p menunjukkan kurang dari 0,05 namun terdapat beberapa hasil yang menunjukkan bahwa $p > 0,05$ yaitu pada kelompok VI (50 detik) dibandingkan dengan VII (60 detik) yaitu sebesar 1,000 dan kelompok VII (60 detik) dibandingkan dengan VI (50 detik) yaitu sebesar 1,000. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok VI dan VII karena keduanya membunuh seluruh jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*.

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian rerata jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* setelah dilakukan penyinaran didapatkan perbedaan yang bermakna pada seluruh kelompok perlakuan (kontrol, 10 detik, 20 detik, 30 detik, 40 detik, 50 detik dan 60 detik). Hal ini berarti metode PDT dapat membunuh bakteri *Enterococcus faecalis* secara signifikan sesuai dengan penelitian Rios (2011) yang menyebutkan bahwa PDT dengan kombinasi sinar LED dan cairan TBO memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* sehingga berpotensi untuk digunakan sebagai desinfeksi mikroba dalam perawatan endodontik konvensional. ⁶

Pada lama penyinaran 10 detik, 20 detik, 30 detik dan 40 detik masih terdapat jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* yang dihitung dengan Colony Forming Unit dengan rerata 33,67 ; 23,33 ; 16 dan 12,50. Hal ini tidak sesuai dengan penelitian Schlafer (2010) yang menunjukkan bahwa penggunaan fotosan selama 30 detik sesuai dengan protokol penggunaan untuk perawatan endodontik efektif menurunkan jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* (99,7 %) dibandingkan dengan 10 detik dan 20 detik. Perbedaan hasil penelitian ini disebabkan oleh metode penelitian yang digunakan berbeda yaitu penggunaan ukuran tip fiber yang berbeda untuk penyinaran pada tabung eppendorf yang berisi suspensi bakteri. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa penggunaan ukuran tip fiber optikal memberikan hasil yang lebih baik dibanding sinar yang digunakan secara langsung pada kavitas gigi atau saluran akar karena semakin panjang dan kecil ukuran tip fiber dapat membantu memancarkan sinar dari PDT mencapai arah akses ujung apikal yang sulit dicapai. ^{9, 10, 17}

Pada kelompok lama penyinaran detik ke 50 dan 60 menunjukkan angka 0 yang berarti menunjukkan pada lama penyinaran 50 detik sudah cukup efektif untuk membunuh semua bakteri *Enterococcus faecalis*. Hal ini berlawanan dengan pendapat dari Poggio (2011) yang menunjukkan jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* berkurang pada lama penyinaran 90 detik (91,49%) dibandingkan dengan 30 detik (87,72%). Pemberian penyinaran Fotosan yang lebih lama secara signifikan dapat menurunkan persentase jumlah bakteri dibandingkan dengan pemberian penyinaran yang singkat. Perbedaan hasil penelitian tersebut disebabkan oleh perbedaan waktu perlakuan yang hanya membandingkan 30 detik dan 90 detik saja tetapi untuk detik ke-50 belum diteliti sedangkan pada penelitian ini diberi perlakuan lama penyinaran 10 sampai 60 detik dengan interval tiap 10 detik dan didapatkan hasil detik ke 50 bakteri *Enterococcus faecalis* sudah bersih.¹¹

Penelitian ini menggunakan metode *photodynamic therapy* (PDT) untuk desinfeksi saluran akar dengan merk Fotosan. Fotosan menggunakan sinar merah LED dengan panjang gelombang 628 nm serta fotosensitizer TBO. Sesuai dengan penelitian Hopp (2013) yang menyatakan bahwa sinar merah dengan panjang gelombang 628 nm dapat mengaktivasi cairan TBO untuk menghasilkan singlet oksigen reaktif yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel bakteri. Sinar tersebut dapat mencapai kedalaman tubuli dentin akar yang sulit dijangkau oleh bahan desinfeksi irigasi yaitu hingga 0,5 cm – 1,5 cm serta memiliki derajat selektifan tinggi membunuh bakteri *Enterococcus faecalis* tanpa merusak sel host.^{13, 18}

Fotosensitizer yang digunakan pada penelitian ini adalah Toluidine Blue O (TBO). Fotosensitizer TBO tersebut memiliki kandungan *phenothiazine*. *Phenothiazine* bersifat kation yang akan berikatan dengan dinding sel bakteri *Enterococcus faecalis* yang bersifat anion. Dari ikatan tersebut akan terjadi interaksi elektrostatis sehingga meningkatkan permeabilitas dinding sel bakteri yang menyebabkan kation fotosensitizer tersebut lebih masuk ke membran sitoplasma bakteri sehingga dapat mendisorganisasi barrier permeabilitas lebih jauh. Dari penelitian Kikuchi (2015) TBO juga memiliki daya antibakteri karena dapat berinteraksi dengan lipopolisakarida membran sel bakteri walaupun tanpa dilakukan penyinaran. Ketika dilakukan penyinaran dengan panjang gelombang 630 nm akan terjadi penyerapan cairan fotosensitizer yang maksimal sehingga terjadi fotoaktivasi PDT untuk membunuh bakteri yang lebih baik dibandingkan dengan penggunaan cairan fotosensitizer tanpa penyinaran. Hal ini sesuai dengan pendapat Arneiro (2014) bahwa penggunaan TBO tanpa penyinaran jumlah bakteri yang mati lebih sedikit dibandingkan dengan penggunaan TBO dengan penyinaran.^{19, 20}

Sinar LED pada fotosan merupakan sinar merah dengan panjang gelombang 628 nm dengan *output power* 1000mW dan energi 30 J. Sinar tersebut akan menyebabkan terjadinya fenomena absorpsi sinar oleh fotosensitizer yang disebut dengan proses fotofisika. Fase pertama pada proses ini adalah *ground state* yaitu pada fase ini setiap elektron masih dalam keadaan stabil dan berpasangan serta masih berada pada orbitalnya. Setelah diberikan penyinaran maka akan terjadi transfer energi yang menyebabkan molekul

elektron fotosensitizer yang berada pada fase *ground state* berubah menjadi *excited state*. Pada fase ini elektron yang berpasangan mulai tidak stabil. Kemudian meningkat menjadi fase *triplet state* dimana elektron sudah terpisah dari pasangannya sehingga bersifat reaktif dan akan mencari pasangan dengan molekul lainnya. Pada *triplet state* ini merupakan keadaan yang reaktif, namun dalam keadaan ini terjadi interaksi secara kimiawi antara elektron dari molekul dengan oksigen yang memiliki konfigurasi elektron pada keadaan stabil. Karena adanya interaksi tersebut menyebabkan konfigurasi elektron dari molekul oksigen berada pada keadaan tereksitasi (tidak stabil). Oksigen tereksitasi cenderung akan berusaha ke kondisi elektron yang stabil, sehingga oksigen ini akan melakukan interaksi dengan sistem biologi disekitarnya. Interaksi yang terjadi antara oksigen tereksitasi dan sistem biologi seperti sel bakteri akan merusak sistem dan struktur sel tersebut. ^{12,14}

Hasil dari interaksi tersebut akan menghasilkan dua tipe mekanisme. Pada tipe I terjadi transfer elektron antara fotosensitizer dengan substrat sehingga akan menghasilkan ion – ion radikal yang disebut dengan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang terdiri dari superoksida anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikal ($^{\bullet}OH$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Ion – ion tersebut bersifat oksidatif terhadap sel. Pada tipe II terjadi transfer elektron antara fotosensitizer dengan reseptor oksigen (O_2) yang akan menghasilkan singlet oksigen (1O_2). Singlet oksigen ini merupakan bentuk oksigen yang reaktif dan agen oksidatif yang kuat. ROS dan singlet oksigen tersebut akan menyebabkan kerusakan pada lisosom, mitokondria dan membran plasma bakteri. ¹⁴

Kerusakan tersebut terjadi karena ROS dan singlet oksigen menyebabkan stres oksidatif sehingga terjadi peroksidasi lipid pada membran plasma dan organel. Ikatan asam lemak dengan radikal bebas yang tidak stabil dapat menyebabkan kerusakan pada membran yang lebih parah, juga dapat menyebabkan oksidasi rantai asam amino, pembentukan ikatan kovalen protein – protein dan oksidasi protein. Hal ini akan menyebabkan kerusakan struktur protein, meningkatkan proteasomal degradasi protein. Selain itu dapat menyebabkan pemanjangan crosslinking rantai DNA, inaktivasi enzim NaDH *succinate* dan laktat dehidrogenase, merusak keseimbangan ion K^+ dan ion lainnya, serta dapat merusak DNA sel bakteri sehingga menyebabkan kematian pada bakteri. ^{4,14}

Dari hasil uji pada masing – masing kelompok, kelompok II (penyinaran 10 detik) merupakan kelompok yang memiliki kemampuan membunuh bakteri *Enterococcus faecalis* yang paling sedikit. Hal ini disebabkan karena lama penyinaran yang kurang akan menyebabkan konsentrasi terbentuknya ion radikal dan singlet oksigen lebih sedikit sehingga jumlah bakteri yang mati menjadi kurang optimal. Pada kelompok VI (penyinaran 50 detik) dan kelompok VII (penyinaran 60 detik) memiliki kemampuan membunuh bakteri *Enterococcus faecalis* yang paling baik. Pada kelompok VI jumlah bakteri sudah bersih sehingga dapat disimpulkan bahwa pada detik ke- 50 merupakan waktu efektif penyinaran PDT untuk membunuh semua jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*. Hal tersebut menunjukkan pentingnya lama penyinaran akan menghasilkan konsentrasi **molekul** fotosensitizer yang berada pada *ground (singlet) state*,

excited singlet state dan *triplet state* yang cukup besar sehingga konsentrasi ion radikal dan singlet oksigen juga banyak. Konsentrasi ion radikal dan singlet oksigen yang banyak tersebut akan menyebabkan kerusakan pada adalah lisosom, mitokondria, dan membran plasma sel bakteri lebih besar dan sel bakteri yang mati jumlahnya lebih banyak. ^{12, 14}

KESIMPULAN

Semakin lama penyinaran **pada proses** *photodynamic therapy* maka semakin sedikit jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*. Lama penyinaran 50 detik merupakan waktu yang paling efektif untuk membunuh seluruh jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*

DAFTAR PUSTAKA

1. Alagl AS, Bedi S, Almas K. Phytosolutions for *Enterococcus faecalis* in Endodontics: An Update. OHDM. 2016; 15(5): 332.
2. Pourhajibaghera M, Kazemianb H, Chiniforushd N, Hosseinie N, Pourakbarif B, Azizollahig A, et al. Exploring different photosensitizers to optimize elimination of planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis* from infected root canal during antimicrobial photodynamic therapy. Journal Elsevier. 2018; 24: 206-211.
3. Filipov I, Markova K, Boyadzhieva E. Efficiency of Photoactivated Disinfection on Experimental Biofilm – Scanning Electron Microscopy Results. Journal of IMAB. 2013; 19(4): 383-387.
4. Xhevdet A, Stubljarić D, Kriznar I, Jukić T, Skvarc M, Veranić P, et al. The Disinfecting Efficacy of Root Canals with Laser Photodynamic Therapy. J of Lasers in Med Sci. 2014; 5(1): 19-26.
5. Lins CCSA, Melo ARS, Silva CC, Oliveira JB, Lima GA, Castro CCMB, et al. Photodynamic Therapy Application in Endodontic Aerobic Microorganisms and Facultative Anaerobic. Formatex. 2015; 2(1): 559-563.
6. Luis M, Marie T, Pezzlo. Color Atlas of Medical Bacteriology. 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press. 2013; 67-90.
7. Yildirim C, Karaarslan ES, Ozsevik S, Zer Y, Sari T, Usumez A. Antimicrobial Efficiency of Photodynamic Therapy with Different Irradiation Durations. Eur J Dent. 2013; 7(4): 469-473.
8. Jimenez L, Fusté M, Garriga A, Domínguez V, Viñas. Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms. Lasers Med Sci. 2015; 30(1): 1519–1526.
9. Bago I, Plecko V, Gabric PD, Schauper Z, Barabai A, Anic I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. International Endodontic Journal. 2012; 4(2): 1-9.
10. Schlafer S, Vaeth M, Preben HB, Frandsen EVG. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source : an in vitro and ex vivo study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109(4): 634-641.
11. Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Florindi F, Chiesa M, Saino E, et al. Photoactivated disinfection (PAD) in endodontics: an in vitro microbiological evaluation. Int J Artif Organs. 2011; 34(9): 889-897.
12. Lestari, Winda Puji. Potensi Inaktivasi *Streptococcus mutans* dengan Penambahan Fotosensitisier Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) pada Aplikasi Fotodinamik Light Emitting Diode (LED). Skripsi. Departemen Fisika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. 2017.

13. Kishen A, Shrestha A. Photodynamic Therapy for Root Canal Disinfection. Endodontic Irrigation. 2015; 14(1): 231-252.
14. Dai, Tianhong, Beth B. Fuchs, Jeffrey J. Coleman, Renato A. Prates, Christos Astrakas, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. Frontiers in Microbiology. 2012; 3(120): 1-16.
15. Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. Laboratory Methods for Detection of Antibacterial Resistance. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology 8th ed. Mosby Inc. St. Louis. Philadelphia. 2002; 478.
16. Rios A, He J, Glickman G, Spears R, Schneiderman E, Honeyman A. Evaluation of Photodynamic Therapy Using a Light- emitting Diode Lamp against Enterococcus faecalis in Extracted Human Teeth. Journal of Endodontic. 2011; 37(6): 856-859.
17. Garcez AS, Fregnani ER, Rodriguez HM, Nunez SC, Sabino CP, Suzuki H. The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant?. Lasers Med Sci. 2013; 28(1): 79–85.
18. Hopp M, Biffar R. Photodynamic therapies blue versus green. Germany: Greifswald University. 2013; 10-25.
19. Kikuchi T, Mogi M, Okabe I, Okada K, Goto H, Sasaki Y, et al. Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in nonsurgical periodontal treatment : a review of literature. Int J Mol Sci. 2015; 16(3) : 24111 – 24126.
20. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobactericidal Efficacy Against Gram-Positive and Gram-Negative Microorganisms. Lasers in Surg Med. 2001; 29(2): 165-173.

"Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)" dental_journal@fkg.unair.ac.id

Re: Revisi naskah journal kez

To: Nanik Zubaidah nanik-z@fkg.unair.ac.id

terima kasih Dokter

Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)

<http://e-journal.unair.ac.id/MKG>

Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga
Jl. Mayjend. Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60132
Another Email: dental_journal@yahoo.com
Phone/Fax: +6231 5039478

Pada tanggal Jum, 6 Mar 2020 pukul 11.23 Nanik Zubaidah <nanik-z@fkg.unair.ac.id> menulis:
Sy kirim naskah revisi ke 2 ...mhn diterima...trmkasih

Wass

Drg Nanik Zubaidah

Nanik Zubaidah nanik-z@fkg.unair.ac.id

Re: Revisi naskah journal kez

To: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga <dental_journal@fkg.unair.ac.id>

Mhn maaf ... Saat dilakukan penelitian ini kami tidak melakukan uji laik etik karena penelitian kami secara in-vitro dan sampel yang kami gunakan hanya bakteri E.Faecalis dan alat photodynamic therapi...Oleh karena itu mohon maaf dalam merevisi di journal tersebut tidak kami lakukan. Trmkasih

Wass
Nanik Z

On Fri, Mar 6, 2020 at 11:23 AM Nanik Zubaidah <nanik-z@fkg.unair.ac.id> wrote:
Sy kirim naskah revisi ke 2 ...mhn diterima...trmkasih

Wass

Drg Nanik Zubaidah

"Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)" dental_journal@fkg.unair.ac.id

Pemberitahuan revisi ke-3 naskah

To: Nanik Zubaidah <nanik-z@fkg.unair.ac.id>, nanikzubaidah@yahoo.com

Kepada Yth.

Nanik Zubaidah, drg., M.Kes., Sp.KG(K)

Departemen Konservasi Gigi

Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Airlangga

Kami beritahukan bahwa naskah sejawat dengan judul :

Efektifitas Lama Penyinaran LED Pada *Photodynamic Therapy* Terhadap Penurunan Jumlah Bakteri *Enterococcus Faecalis*

Authors: Dinda Dewi Artini¹, Nanik Zubaidah², Agus Subiwahjudi³, Karina Erda Saninggar⁴

telah kami telaah melalui tinjauan Penyunting Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi). Agar naskah tersebut dapat kami proses lebih lanjut, sejawat dimohon melakukan perbaikan sesuai dengan catatan penyunting yang tertulis pada naskah.

Hasil perbaikan naskah mohon diberi tanda seperti pada contoh tabel revisi (terlampir) dan dikirim kembali ke alamat E-mail: dental_journal@fkg.unair.ac.id selambat-lambatnya tanggal **20 Maret 2020**. Apabila sampai batas waktu yang kami tentukan penulis belum mengirimkan kembali revisi naskah tersebut sesuai dengan masukan yang diberikan oleh Penyunting, maka kami anggap penulis telah **membatalkan** artikel tersebut untuk diterbitkan pada Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi). Penentuan penerimaan naskah berdasarkan hasil revisi yang dikirimkan.

Atas perhatiannya, kami ucapkan terima kasih.

Hormat Kami,

Ketua Penyunting Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)

Saka Winias, drg., M.Kes., Sp.PM

NIP. 199005152014042000

Efektifitas Lama Penyinaran LED Pada Photodynamic Therapy Terhadap Penurunan Jumlah Bakteri *Enterococcus Faecalis*

ABSTRAK

Latar belakang: Keberhasilan dari perawatan saluran akar adalah dapat mengeliminasi bakteri patogen dari saluran akar yang terinfeksi. Bakteri yang paling sering dapat menyebabkan infeksi saluran akar adalah *Enterococcus faecalis* karena bakteri tersebut resisten terhadap medikamen dan irigasi saluran akar. Photodynamic therapy (PDT) merupakan suatu metode desinfeksi saluran akar menggunakan kombinasi cairan fotosensitizer dan sinar aktivasi untuk mengeliminasi bakteri pada saluran akar. Lama penyinaran PDT dapat mempengaruhi produksi singlet oksigen dan ROS (Reactive Oxygen Species) untuk **mengeliminasi** bakteri *Enterococcus faecalis*. **Tujuan:** Untuk menganalisis perbedaan lama penyinaran photodynamic therapy terhadap jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* **Metode:** Penelitian ini menggunakan kultur bakteri *Enterococcus faecalis* yang terbagi dalam 7 kelompok tabung eppendorf. Kelompok I sebagai kelompok kontrol, kelompok II, III, IV, V, VI dan VII diberi fotosensitizer Toluidine Blue O (TBO) dan diberi perbedaan lama penyinaran 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 detik. Setelah diinkubasi, jumlah bakteri dihitung dengan Quebec Colony Counter dan dianalisis dengan Kruskal Wallis test dan Mann Whitney test **dengan $p < 0,05$** . **Hasil:** Terdapat perbedaan signifikan (**$p < 0,002$**) antara jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* pada tiap kelompok perlakuan. Lama penyinaran PDT yang lebih lama (Kelompok VI dan VII) menunjukkan jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* yang lebih sedikit. **Kesimpulan:** Semakin lama penyinaran PDT maka semakin sedikit jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*. Lama penyinaran 50 detik merupakan waktu yang paling efektif untuk membunuh seluruh jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*.

Keywords: photodynamic therapy, *Enterococcus faecalis*, irradiation time

PENDAHULUAN

Infeksi endodontik terjadi akibat adanya invasi beberapa bakteri pada saluran akar. *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri patogen yang paling banyak ditemukan pada saluran akar (**4-40%**) dan menyebabkan **20-70%** kegagalan perawatan endodontik.^{1,2} Pada beberapa penelitian, *Enterococcus faecalis* banyak ditemukan di dalam saluran akar yang

telah dilakukan perawatan saluran akar, karena bakteri tersebut resisten terhadap beberapa medikamen dan bahan irigasi antimikroba selama perawatan saluran akar.^{3, 4, 5} Di dalam tubulus dentin, *Enterococcus faecalis* dapat bertahan dari medikamen intrakanal Ca(OH)₂ (kalsium hidroksida) sampai lebih dari 10 hari.⁶

Eliminasi bakteri patogen yang ada dalam saluran akar dapat mempengaruhi keberhasilan perawatan saluran akar. Struktur dan bentuk saluran akar yang kompleks merupakan masalah utama dalam pembersihan saluran akar untuk mengeliminasi bakteri patogen tersebut. Bakteri yang tertinggal di dalam saluran akar dapat berpenetrasi pada tubuli dentin akar hingga kedalaman 1000 µm, sedangkan bahan desinfeksi irigasi hanya mencapai kedalaman 100 µm.^{4, 5, 7}

Pada beberapa dekade terakhir dikembangkan *photodynamic therapy* (PDT), yaitu metode desinfeksi menggunakan sinar cahaya (*light activated disinfection*) dengan panjang gelombang tertentu, yang terdiri dari dua komponen yaitu sumber sinar cahaya berupa LED (*Light Emitting Diode*) atau laser diode sebagai fotoaktivasi, dan cairan fotosensitizer yang dapat menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri. Molekul cairan fotosensitizer tersebut diaktifkan dengan sumber cahaya sehingga reaksi tersebut menghasilkan singlet oksigen reaktif yang memiliki efek sitotoksik dan dapat merusak struktur sel bakteri. Penggunaan PDT setelah preparasi mekanis dan irigasi secara kimiawi dapat mengeliminasi bakteri patogen dalam saluran akar secara efektif. Sinar cahaya PDT tersebut dapat menjangkau area saluran akar yang sulit dijangkau dengan irigasi konvensional karena sinar ini dapat mencapai kedalaman 0,5 cm – 1,5 cm tubuli dentin akar. Selain itu sinar tersebut tidak memiliki kandungan toksik dan memiliki derajat selektifan yang tinggi untuk membunuh bakteri melalui reaksi dengan cairan fotosensitizer dan oksigen tanpa merusak sel host. Pada studi *in vivo* dilaporkan bahwa PDT efektif mengeliminasi bakteri yang resisten terhadap beberapa jenis medikamen. Berdasarkan hasil penelitian yang menggunakan PDT berupa Fotosan dapat membunuh bakteri gram positif dan negatif, seperti *Streptococcus mutans* dan *Enterococcus faecalis*.^{8, 9}

Fotosan merupakan *photodynamic therapy* yang menggunakan sinar merah LED (*Light Emitting Diode*) dengan panjang gelombang 630 nm serta cairan fotosensitizer *Toluidine Blue O* (TBO). Menurut protokol penggunaan fotosan untuk perawatan endodontik, fotosensitizer dimasukkan ke dalam saluran akar selama 60 detik agar cairan tersebut kontak dengan dinding saluran akar. Kemudian endodontik tip dari alat tersebut dimasukkan ke dalam saluran akar dan disinari selama 30 detik. Hal ini sesuai dengan penelitian Schlafer yang menunjukkan bahwa penggunaan fotosan selama 30 detik dapat

menurunkan jumlah mikroorganisme patogen penyebab infeksi endodontik (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus intermedius*) dibandingkan dengan 10 detik dan 20 detik secara in vitro dan ex vivo. Namun dari penelitian Poggio didapatkan penurunan jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sanguin* pada waktu penyinaran yang lebih lama yaitu 90 detik. Selain itu dari penelitian Xhevdet *et al* (2014) mengenai PDT didapatkan hasil waktu penyinaran pada bakteri *Enterococcus faecalis* selama 5 menit memiliki efek yang lebih besar dibandingkan penyinaran selama 1 menit dan 3 menit namun tidak memiliki perbedaan yang signifikan antara lama penyinaran dengan berkurangnya jumlah bakteri.^{4, 10, 11}

Keefektifan PDT tergantung pada tingkat kekuatan, durasi, penyerapan dari sinar pada jaringan, geometri dari saluran akar dan jarak ujung alat ke sel target. Fenomena penyerapan sinar oleh fotosensitizer merupakan proses fotofisika yang berlangsung saat molekul fotosensitizer yang memiliki konfigurasi elektron pada keadaan stabil (*ground state*) menyerap cahaya foton. Setelah menyerap cahaya, konfigurasi elektron molekul berubah menjadi tidak stabil (*excited state*). Dari *excited state*, elektron molekul fotosensitizer dapat kembali menjadi *ground state* apabila kehilangan energi atau menjadi *triplet state* apabila terus mendapatkan energi yang cukup. Pada *triplet state* ini merupakan keadaan yang reaktif, namun dalam keadaan ini terjadi interaksi secara kimiawi antara elektron dari molekul dengan oksigen yang memiliki konfigurasi elektron pada keadaan stabil. Karena adanya interaksi tersebut menyebabkan konfigurasi elektron dari molekul oksigen berada pada keadaan tereksitasi (tidak stabil). Oksigen tereksitasi cenderung akan berusaha ke kondisi elektron yang stabil, sehingga oksigen ini akan melakukan interaksi dengan sistem biologi disekitarnya. Interaksi yang terjadi antara oksigen tereksitasi dan sistem biologi seperti sel bakteri akan merusak sistem dan struktur sel tersebut. Hal tersebut menunjukkan pentingnya lama penyinaran untuk menghasilkan oksigen reaktif sehingga dapat menurunkan jumlah bakteri.^{12, 13, 14}

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perbedaan lama penyinaran *photodynamic therapy* (PDT) menggunakan sinar merah LED dan cairan fotosensitizer *Toluidine Blue O* (TBO) terhadap jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*.

BAHAN DAN METODE

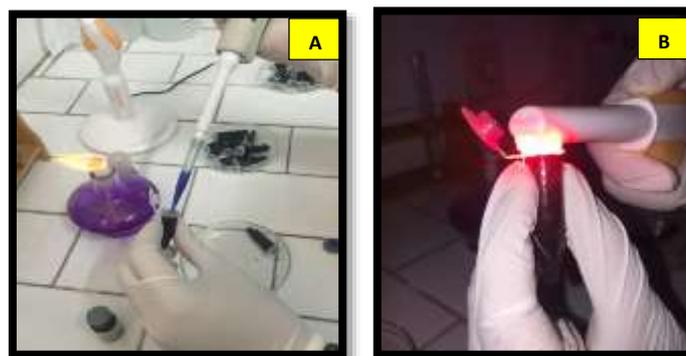
Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Sampel penelitian yang dipakai pada penelitian ini adalah bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Penentuan jumlah

sampel yang digunakan pada penelitian ini menggunakan rumus Lemeshow *et al* 1990, didapatkan jumlah total sampel sebanyak 42. Sampel dibagi menjadi 7 kelompok, kelompok I (KI-K): merupakan kelompok kontrol tanpa penyinaran, kelompok II (KII-10): diberi penyinaran dengan PDT selama 10 detik, kelompok III (KIII-20): 20 detik, kelompok IV (KIV-30): 30 detik, kelompok V (KV-40): 40 detik, kelompok VI (KVI-50): 50 detik, kelompok VII (KVII-60): 60 detik.

Pembuatan kultur bakteri *Enterococcus faecalis* dilakukan dengan pengambilan sediaan kultur bakteri *Enterococcus faecalis* dengan kawat osse dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi *Brain Heart Infusion* (BHI) broth I. Kemudian diaduk dan diinkubasi (37°C) dalam inkubator (48 jam) dengan suasana anaerob (Forbes *et al.*, 2002). Kemudian dari tabung BHI broth I tersebut diambil 0,5 ml dengan mikropipet untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi BHI broth II dan disetarakan dengan skala Mc Farland untuk mendapatkan suspensi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

Pembuatan sampel didapatkan dari tabung reaksi suspensi bakteri diambil 0,5 ml dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam masing – masing 42 tabung eppendorf. Tabung eppendorf tersebut sudah dilapisi dengan lakban hitam¹⁵ agar pada saat penyinaran, sinar PDT tidak diteruskan keluar dinding tabung. Sampel sebanyak 42 tabung eppendorf tersebut dikelompokkan menjadi 7 kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 6 buah tabung eppendorf.

Kelompok I merupakan kelompok kontrol (tanpa fotosensitizer dan tanpa penyinaran), hanya berisi sampel bakteri *Enterococcus faecalis*. Kelompok II diberi fotosensitizer berupa cairan Toluidine Blue O (TBO) sebanyak 0,5 ml dan ditunggu selama 60 detik, kemudian dilakukan penyinaran dengan sinar LED selama 10 detik. Untuk selanjutnya, kelompok III sampai kelompok VII diberi perlakuan seperti kelompok II dengan urutan lama penyinaran dengan sinar LED selama 20 detik, 30 detik, 40 detik, 50 detik dan 60 detik.^{10, 11}



Gambar 1 (a) Pemberian 0,5 ml Fotosensitizer TBO ke Dalam Tabung Eppendorf yang Berisi 0,5 ml Bakteri *Enterococcus faecalis* (b) Penyinaran dengan sinar LED Sesuai dengan Kelompok Perlakuan

Setelah semua kelompok dilakukan penyinaran, masing – masing tabung eppendorf (kelompok I – VII) diambil 0,1 ml dengan mikropipet dan ditanam di petridish berisi nutrisi agar. Petridish berisi media nutrisi agar tersebut diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C dalam suasana anaerob.

Setelah diinkubasi, jumlah koloni bakteri pada petridish dihitung menggunakan *iebec Colony Counter* dengan metode CFU (*Colony Forming Unit*) dan digunakan sebagai data setelah penyinaran untuk dianalisis data. ⁹

HASIL

Dari penghitungan statistik, didapatkan hasil rata-rata dan standar deviasi jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* setelah dilakukan penyinaran seperti tabel 1.

Tabel 1. Rerata Dan Standar Deviasi Jumlah Koloni Bakteri *Enterococcus faecalis* Setelah Dilakukan Penyinaran

KELOMPOK	N	Mean	SD
KI K	6	116.67	4.67
KII 10	6	33.67	4.32
KIII 20	6	23.33	3.72
KIV 30	6	16.00	2.19
KV 40	6	12.50	2.73
KVI 50	6	.00	.000
KVII 60	6	.00	.000
Rata - rata	42	28.88	38.09

Dari hasil rerata setelah penyinaran dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan menunjukkan nilai $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa semua kelompok perhitungan mempunyai distribusi data yang normal. Kemudian data tersebut dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan uji statistik *Levene Test* dan didapatkan $p < 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa data pada ketujuh kelompok tidak mempunyai varians yang homogen.

Setelah dilakukan uji normalitas dan homogenitas maka selanjutnya digunakan *Kruskal Wallis Test* untuk mengetahui perbedaan secara keseluruhan kelompok. Dari hasil uji didapatkan nilai $p < 0,05$. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan

bermakna antara jumlah koloni bakteri *Enterococcus Faecalis* pada seluruh kelompok perlakuan. Pada uji *Mann Whitney* memiliki syarat $p < 0,05$ untuk menunjukkan ada perbedaan bermakna pada tiap kelompok. Pada tabel tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara kelompok I (kontrol) dengan kelompok perlakuan yang lain (kelompok II, III, IV, V, VI, VII).

Tabel 2 Hasil Uji *Mann Whitney*

KELOMPOK	KI K	KII 10	KIII 20	KIV 30	KV 40	KVI 50	KVII 60
KI K	-	0.004*	0.004*	0.004*	0.004*	0.002*	0.002*
KII 10	-	-	0.004*	0.004*	0.004*	0.002*	0.002*
KIII 20	-	-	-	0.004*	0.004*	0.002*	0.002*
KIV 30	-	-	-	-	0.044*	0.002*	0.002*
KV 40	-	-	-	-	-	0.002*	0.002*
KVI 50	-	-	-	-	-	-	1.000
KVII 60	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : *) ada perbedaan bermakna

Pada tabel tersebut sebagian besar p menunjukkan kurang dari 0,05 namun terdapat beberapa hasil yang menunjukkan bahwa $p > 0,05$ yaitu pada kelompok VI (50 detik) dibandingkan dengan VII (60 detik) yaitu sebesar 1,000 dan kelompok VII (60 detik) dibandingkan dengan VI (50 detik) yaitu sebesar 1,000. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok VI dan VII karena keduanya membunuh seluruh jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*.

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian rerata jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* setelah dilakukan penyinaran didapatkan perbedaan yang bermakna pada seluruh kelompok perlakuan (kontrol, 10 detik, 20 detik, 30 detik, 40 detik, 50 detik dan 60 detik). Hal ini berarti metode PDT dapat membunuh bakteri *Enterococcus faecalis* secara signifikan sesuai dengan penelitian Rios (2011) yang menyebutkan bahwa PDT dengan kombinasi sinar LED dan cairan TBO memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Enterococcus*

faecalis sehingga berpotensi untuk digunakan sebagai desinfeksi mikroba dalam perawatan endodontik konvensional.¹⁶

Pada lama penyinaran 10 detik, 20 detik, 30 detik dan 40 detik masih terdapat jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* yang dihitung dengan Colony Forming Unit dengan rerata 33,67 ; 23,33 ; 16 dan 12,50. Hal ini tidak sesuai dengan penelitian Schlafer (2010) yang menunjukkan bahwa penggunaan fotosan selama 30 detik sesuai dengan protokol penggunaan untuk perawatan endodontik efektif menurunkan jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* (99,7 %) dibandingkan dengan 10 detik dan 20 detik. Perbedaan hasil penelitian ini disebabkan oleh metode penelitian yang digunakan berbeda yaitu penggunaan ukuran tip fiber yang berbeda untuk penyinaran pada tabung eppendorf yang berisi suspensi bakteri. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa penggunaan ukuran tip fiber optikal memberikan hasil yang lebih baik dibanding sinar yang digunakan secara langsung pada kavitas gigi atau saluran akar karena semakin panjang dan kecil ukuran tip fiber dapat membantu memancarkan sinar dari PDT mencapai arah akses ujung apikal yang sulit dicapai.^{9, 10, 17}

Pada kelompok lama penyinaran detik ke 50 dan 60 menunjukkan angka 0 yang berarti menunjukkan pada lama penyinaran 50 detik sudah cukup efektif untuk membunuh semua bakteri *Enterococcus faecalis*. Hal ini berlawanan dengan pendapat dari Poggio (2011) yang menunjukkan jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* berkurang pada lama penyinaran 90 detik (91,49%) dibandingkan dengan 30 detik (87,72%). Pemberian penyinaran Fotosan yang lebih lama secara signifikan dapat menurunkan persentase jumlah bakteri dibandingkan dengan pemberian penyinaran yang singkat. Perbedaan hasil penelitian tersebut disebabkan oleh perbedaan waktu perlakuan yang hanya membandingkan 30 detik dan 90 detik saja tetapi untuk detik ke-50 belum diteliti sedangkan pada penelitian ini diberi perlakuan lama penyinaran 10 sampai 60 detik dengan interval tiap 10 detik dan didapatkan hasil detik ke 50 bakteri *Enterococcus faecalis* sudah bersih.¹¹

Penelitian ini menggunakan metode *photodynamic therapy* (PDT) untuk desinfeksi saluran akar dengan merk Fotosan. Fotosan menggunakan sinar merah LED dengan panjang gelombang 628 nm serta fotosensitizer TBO. Sesuai dengan penelitian Hopp (2013) yang menyatakan bahwa sinar merah dengan panjang gelombang 628 nm dapat mengaktivasi cairan TBO untuk menghasilkan singlet oksigen reaktif yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel bakteri. Sinar tersebut dapat mencapai kedalaman tubuli dentin akar yang sulit dijangkau oleh bahan desinfeksi irigasi yaitu

hingga 0,5 cm – 1,5 cm serta memiliki derajat selektivitas tinggi membunuh bakteri *Enterococcus faecalis* tanpa merusak sel host. ^{13, 18}

Fotosensitizer yang digunakan pada penelitian ini adalah Toluidine Blue O (TBO). Fotosensitizer TBO tersebut memiliki kandungan *phenothiazine*. *Phenothiazine* bersifat kation yang akan berikatan dengan dinding sel bakteri *Enterococcus faecalis* yang bersifat anion. Dari ikatan tersebut akan terjadi interaksi elektrostatik sehingga meningkatkan permeabilitas dinding sel bakteri yang menyebabkan kation fotosensitizer tersebut lebih masuk ke membran sitoplasma bakteri sehingga dapat mendisorganisasi barrier permeabilitas lebih jauh. Dari penelitian Kikuchi (2015) TBO juga memiliki daya antibakteri karena dapat berinteraksi dengan lipopolisakarida membran sel bakteri walaupun tanpa dilakukan penyinaran. Ketika dilakukan penyinaran dengan panjang gelombang 630 nm akan terjadi penyerapan cairan fotosensitizer yang maksimal sehingga terjadi fotoinaktivasi PDT untuk membunuh bakteri yang lebih baik dibandingkan dengan penggunaan cairan fotosensitizer tanpa penyinaran. Hal ini sesuai dengan pendapat Arneiro (2014) bahwa penggunaan TBO tanpa penyinaran jumlah bakteri yang mati lebih sedikit dibandingkan dengan penggunaan TBO dengan penyinaran. ^{19, 20}

Sinar LED pada fotosan merupakan sinar merah dengan panjang gelombang 628 nm dengan *output power* 1000mW dan energi 30 J. Sinar tersebut akan menyebabkan terjadinya fenomena absorpsi sinar oleh fotosensitizer yang disebut dengan proses fotofisika. Fase pertama pada proses ini adalah *ground state* yaitu pada fase ini setiap elektron masih dalam keadaan stabil dan berpasangan serta masih berada pada orbitalnya. Setelah diberikan penyinaran maka akan terjadi transfer energi yang menyebabkan **molekul elektron** fotosensitizer yang berada pada fase *ground state* berubah menjadi *excited state*. Pada fase ini elektron yang berpasangan mulai tidak stabil. Kemudian meningkat menjadi fase *triplet state* dimana elektron sudah terpisah dari pasangannya sehingga bersifat reaktif dan akan mencari pasangan dengan molekul lainnya. Pada *triplet state* ini merupakan keadaan yang reaktif, namun dalam keadaan ini terjadi interaksi secara kimiawi antara elektron dari molekul dengan oksigen yang memiliki konfigurasi elektron pada keadaan stabil. Karena adanya interaksi tersebut menyebabkan konfigurasi elektron dari molekul oksigen berada pada keadaan tereksitasi (tidak stabil). Oksigen tereksitasi cenderung akan berusaha ke kondisi elektron yang stabil, sehingga oksigen ini akan melakukan interaksi dengan sistem biologi disekitarnya. Interaksi yang terjadi antara oksigen tereksitasi dan sistem biologi seperti sel bakteri akan merusak sistem dan struktur sel tersebut. ^{12, 14}

Hasil dari interaksi tersebut akan menghasilkan dua tipe mekanisme. Pada tipe I terjadi transfer elektron antara fotosensitizer dengan substrat sehingga akan menghasilkan ion – ion radikal yang disebut dengan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang terdiri dari superoksida anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikal ($\bullet OH$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Ion – ion tersebut bersifat oksidatif terhadap sel. Pada tipe II terjadi transfer elektron antara fotosensitizer dengan reseptor oksigen (O_2) yang akan menghasilkan singlet oksigen (1O_2). Singlet oksigen ini merupakan bentuk oksigen yang reaktif dan agen oksidatif yang kuat. ROS dan singlet oksigen tersebut akan menyebabkan kerusakan pada lisosom, mitokondria dan membran plasma bakteri. ¹⁴

Kerusakan tersebut terjadi karena ROS dan singlet oksigen menyebabkan stres oksidatif sehingga terjadi peroksidasi lipid pada membran plasma dan organel. Ikatan asam lemak dengan radikal bebas yang tidak stabil dapat menyebabkan kerusakan pada membran yang lebih parah, juga dapat menyebabkan oksidasi rantai asam amino, pembentukan ikatan kovalen protein – protein dan oksidasi protein. Hal ini akan menyebabkan kerusakan struktur protein, meningkatkan proteasomal degradasi protein. Selain itu dapat menyebabkan pemanjangan crosslinking rantai DNA, inaktivasi enzim NaDH *succinate* dan laktat dehidrogenase, merusak keseimbangan ion K^+ dan ion lainnya, serta dapat merusak DNA sel bakteri sehingga menyebabkan kematian pada bakteri. ^{4, 14}

Dari hasil uji pada masing – masing kelompok, kelompok II (penyinaran 10 detik) merupakan kelompok yang memiliki kemampuan membunuh bakteri *Enterococcus faecalis* yang paling sedikit. Hal ini disebabkan karena lama penyinaran yang kurang akan menyebabkan konsentrasi terbentuknya ion radikal dan singlet oksigen lebih sedikit sehingga jumlah bakteri yang mati menjadi kurang optimal. Pada kelompok VI (penyinaran 50 detik) dan kelompok VII (penyinaran 60 detik) memiliki kemampuan membunuh bakteri *Enterococcus faecalis* yang paling baik. Pada kelompok VI jumlah bakteri sudah bersih sehingga dapat disimpulkan bahwa pada detik ke- 50 merupakan waktu efektif penyinaran PDT untuk membunuh semua jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*. Hal tersebut menunjukkan pentingnya lama penyinaran akan menghasilkan konsentrasi molekul fotosensitizer yang berada pada *ground (singlet) state*, *excited singlet state* dan *triplet state* yang cukup besar sehingga konsentrasi ion radikal dan singlet oksigen juga banyak. Konsentrasi ion radikal dan singlet oksigen yang banyak tersebut akan menyebabkan kerusakan pada adalah lisosom, mitokondria, dan membran plasma sel bakteri lebih besar dan sel bakteri yang mati jumlahnya lebih banyak. ^{12, 14}

KESIMPULAN

Semakin lama penyinaran pada proses *photodynamic therapy* maka semakin sedikit jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*. Lama penyinaran 50 detik merupakan waktu yang paling efektif untuk membunuh seluruh jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*

DAFTAR PUSTAKA

1. Alagl AS, Bedi S, Almas K. Phytosolutions for *Enterococcus faecalis* in Endodontics: An Update. *OHDM*. 2016; 15(5): 332.
2. Pourhajibaghara M, Kazemianb H, Chiniforushd N, Hosseinie N, Pourakbarif B, Azizollahig A, et al. Exploring different photosensitizers to optimize elimination of planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis* from infected root canal during antimicrobial photodynamic therapy. *Journal Elsevier*. 2018; 24: 206-211.
3. Filipov I, Markova K, Boyadzhieva E. Efficiency of Photoactivated Disinfection on Experimental Biofilm – Scanning Electron Microscopy Results. *Journal of IMAB*. 2013; 19(4): 383-387.
4. Xhevdet A, Stubljarić D, Kriznar I, Jukić T, Skvarc M, Veranić P, et al. The Disinfecting Efficacy of Root Canals with Laser Photodynamic Therapy. *J of Lasers in Med Sci*. 2014; 5(1): 19-26.
5. Lins CCSA, Melo ARS, Silva CC, Oliveira JB, Lima GA, Castro CCMB, et al. Photodynamic Therapy Application in Endodontic Aerobic Microorganisms and Facultative Anaerobic. *Formatex*. 2015; 2(1): 559-563.
6. Luis M, Marie T, Pezzlo. *Color Atlas of Medical Bacteriology*. 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press. 2013; 67-90.
7. Yildirim C, Karaarslan ES, Ozsevik S, Zer Y, Sari T, Usumez A. Antimicrobial Efficiency of Photodynamic Therapy with Different Irradiation Durations. *Eur J Dent*. 2013; 7(4): 469-473.
8. Jimenez L, Fusté M, Garriga A, Domínguez V, Viñas. Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(1): 1519–1526.
9. Bago I, Plecko V, Gabric PD, Schauer Z, Barabai A, Anic I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *International Endodontic Journal*. 2012; 4(2): 1-9.
10. Schlafer S, Vaeth M, Preben HB, Frandsen EVG. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source : an in vitro and ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(4): 634-641.
11. Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Florindi F, Chiesa M, Saino E, et al. Photoactivated disinfection (PAD) in endodontics: an in vitro microbiological evaluation. *Int J Artif Organs*. 2011; 34(9): 889-897.
12. Lestari, Winda Puji. Potensi Inaktivasi *Streptococcus mutans* dengan Penambahan Fotosensitizer Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) pada Aplikasi Fotodinamik Light Emitting Diode (LED). Skripsi. Departemen Fisika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. 2017.
13. Kishen A, Shrestha A. Photodynamic Therapy for Root Canal Disinfection. *Endodontic Irrigation*. 2015; 14(1): 231-252.

14. Dai, Tianhong, Beth B. Fuchs, Jeffrey J. Coleman, Renato A. Prates, Christos Astrakas, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in Microbiology*. 2012; 3(120): 1-16.
15. Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. *Laboratory Methods for Detection of Antibacterial Resistance*. Balley & Scott's Diagnostic Microbiology 8th ed. Mosby Inc. St. Louis. Philadelphia. 2002; 478.
16. Rios A, He J, Glickman G, Spears R, Schneiderman E, Honeyman A. Evaluation of Photodynamic Therapy Using a Light- emitting Diode Lamp against *Enterococcus faecalis* in Extracted Human Teeth. *Journal of Endodontic*. 2011; 37(6): 856-859.
17. Garcez AS, Fregnani ER, Rodriguez HM, Nunez SC, Sabino CP, Suzuki H. The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant?. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(1): 79–85.
18. Hopp M, Biffar R. *Photodynamic therapies blue versus green*. Germany: Greifswald University. 2013; 10-25.
19. Kikuchi T, Mogi M, Okabe I, Okada K, Goto H, Sasaki Y, et al. Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in nonsurgical periodontal treatment : a review of literature. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(3) : 24111 – 24126.
20. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobactericidal Efficacy Against Gram-Positive and Gram-Negative Microorganisms. *Lasers in Surg Med*. 2001; 29(2): 165-173.

No.	Saran Reviewer	Sebelum Revisi	Revisian (Pembetulan)	Keterangan
KOREKSI KE-1				
Penyunting Ahli ke-1 (PA-1)				
1.				Halaman: Paragraf:
2.				Halaman: Paragraf:
3.				Halaman: Paragraf:
Penyunting Ahli ke-2 (PA-2)				
1.				Halaman: Paragraf:
2.				Halaman: Paragraf:
3.				
4.				
5.				
6.				
Managing Editor				
1.				Halaman: Paragraf:
2.				Halaman: Paragraf:
3.				Halaman: Paragraf:
KOREKSI KE-2				

Efektifitas Lama Penyinaran LED-Light Emitting Diode pada Photodynamic Therapy Terhadap Penurunan Jumlah Bakteri *Enterococcus Faecalis*: In Vitro Study

ABSTRAK

Latar belakang: Keberhasilan dari perawatan saluran akar adalah dapat mengeliminasi bakteri patogen dari saluran akar yang terinfeksi. Bakteri yang paling sering dapat menyebabkan infeksi saluran akar adalah *Enterococcus faecalis* karena bakteri tersebut resisten terhadap medikamen dan irigasi saluran akar. Photodynamic therapy (PDT) merupakan suatu metode desinfeksi saluran akar menggunakan kombinasi cairan fotosensitizer dan sinar aktivasi untuk mengeliminasi bakteri pada saluran akar. Lama penyinaran PDT dapat mempengaruhi produksi singlet oksigen dan ROS (Reactive Oxygen Species (ROS)) untuk mengeliminasi bakteri *Enterococcus E. faecalis*. **Tujuan:** Untuk menganalisis perbedaan lama penyinaran photodynamic therapy terhadap jumlah bakteri *Enterococcus E. faecalis*. **Metode:** Penelitian ini menggunakan kultur bakteri *Enterococcus E. faecalis* yang terbagi dalam 7 kelompok tabung eppendorf. Kelompok I sebagai kelompok kontrol, kelompok II, III, IV, V, VI dan VII diberi fotosensitizer Toluidine Blue O (TBO) dan diberi perbedaan lama penyinaran 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 detik. Setelah diinkubasi, jumlah bakteri dihitung dengan Quebec Colony Counter dan dianalisis dengan Kruskal Wallis test dan Mann Whitney test dengan ($p < 0,05$). **Hasil:** Terdapat perbedaan signifikan ($p = 0,002$; $p < 0,05$) antara jumlah koloni bakteri *E. faecalis* pada tiap kelompok perlakuan. Lama penyinaran PDT yang lebih lama yakni (Kelompok VI dan VII) menunjukkan jumlah bakteri *E. faecalis* yang lebih sedikit. **Kesimpulan:** Semakin lama penyinaran PDT maka semakin sedikit jumlah bakteri *E. faecalis*. Lama penyinaran 50 detik merupakan waktu yang paling efektif untuk membunuh seluruh jumlah bakteri *E. faecalis*. **Keywords:** photodynamic therapy, *Enterococcus faecalis*, Irradiation Time, Light Emitting Diode, Photodynamic therapy, Root Canal Treatment

PENDAHULUAN

Infeksi endodontik terjadi akibat adanya invasi beberapa bakteri pada saluran akar. *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri patogen yang paling banyak ditemukan pada saluran akar (4-40%) dan menyebabkan 20-70% kegagalan perawatan endodontik.^{1,2} Pada

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Not Italic

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Italic

Formatted: Font: Not Italic

beberapa penelitian, *Enterococcus faecalis* banyak ditemukan di dalam saluran akar yang telah dilakukan perawatan saluran akar, karena bakteri tersebut resisten terhadap beberapa medikamen dan bahan irigasi antimikroba selama perawatan saluran akar.^{3, 4, 5} Di dalam tubulus dentin, *E. faecalis* dapat bertahan dari medikamen intrakanal kalsium hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ (kalsium hidroksida) sampai lebih dari 10 hari.⁶

Eliminasi bakteri patogen yang ada dalam saluran akar dapat mempengaruhi keberhasilan perawatan saluran akar. Struktur dan bentuk saluran akar yang kompleks merupakan masalah utama dalam pembersihan saluran akar untuk mengeliminasi bakteri patogen tersebut. Bakteri yang tertinggal di dalam saluran akar dapat berpenetrasi pada tubuli dentin akar hingga kedalaman 1000 μm , sedangkan bahan desinfeksi irigasi hanya mencapai kedalaman 100 μm .^{4, 5, 7}

Pada beberapa dekade terakhir dikembangkan *photodynamic therapy* (PDT), yaitu metode desinfeksi menggunakan sinar cahaya (*light activated disinfection*) dengan panjang gelombang tertentu, yang terdiri dari dua komponen yaitu sumber sinar cahaya berupa LED (*Light Emitting Diode* (LED)) atau laser diode sebagai fotoaktivasi, dan cairan fotosensitizer yang dapat menyebabkan fotoaktivasi pada bakteri. Molekul cairan fotosensitizer tersebut diaktifkan dengan sumber cahaya sehingga reaksi tersebut menghasilkan singlet oksigen reaktif yang memiliki efek sitotoksik dan dapat merusak struktur sel bakteri. Penggunaan PDT setelah preparasi mekanis dan irigasi secara kimiawi dapat mengeliminasi bakteri patogen dalam saluran akar secara efektif. Sinar cahaya PDT tersebut dapat menjangkau area saluran akar yang sulit dijangkau dengan irigasi konvensional karena sinar ini dapat mencapai kedalaman 0,5 cm – 1,5 cm tubuli dentin akar. Selain itu, sinar tersebut tidak memiliki kandungan toksik dan memiliki derajat selektifan yang tinggi untuk membunuh bakteri melalui reaksi dengan cairan fotosensitizer dan oksigen tanpa merusak sel host. Pada studi *in vivo* dilaporkan bahwa PDT efektif mengeliminasi bakteri yang resisten terhadap beberapa jenis medikamen. Berdasarkan hasil penelitian yang menggunakan PDT berupa Fotosan dapat membunuh bakteri gram positif dan negatif, seperti *Streptococcus mutans* dan *E. faecalis*.^{8, 9}

Fotosan merupakan *photodynamic therapy* yang menggunakan sinar merah LED (*Light Emitting Diode* (LED)) dengan panjang gelombang 630 nm serta cairan fotosensitizer *Toluidine Blue O* (TBO). Menurut protokol penggunaan fotosan untuk perawatan endodontik, fotosensitizer dimasukkan ke dalam saluran akar selama 60 detik agar cairan tersebut kontak dengan dinding saluran akar. Kemudian, endodontik tip dari alat tersebut dimasukkan ke dalam saluran akar dan disinari selama 30 detik. Hal ini sesuai dengan

penelitian Schlafer yang menunjukkan bahwa penggunaan fotosan selama 30 detik dapat menurunkan jumlah mikroorganisme patogen penyebab infeksi endodontik (*Escherichia coli*, *E. nterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus intermedius*) dibandingkan dengan 10 detik dan 20 detik secara *in vitro* dan *ex vivo*. Namun, dari penelitian Poggio didapatkan penurunan jumlah bakteri *E. nterococcus faecalis*, *S. nterococcus mutans* dan *Streptococcus sanguin* pada waktu penyinaran yang lebih lama yaitu 90 detik. Selain itu dari penelitian Xhevdet *etal.* (2014) mengenai PDT didapatkan hasil waktu penyinaran pada bakteri *E. nterococcus faecalis* selama 5 menit memiliki efek yang lebih besar dibandingkan penyinaran selama 1 menit dan 3 menit namun tidak memiliki perbedaan yang signifikan antara lama penyinaran dengan berkurangnya jumlah bakteri.^{4, 10, 11}

Keefektifan PDT tergantung pada tingkat kekuatan, durasi, penyerapan dari sinar pada jaringan, geometri dari saluran akar dan jarak ujung alat ke sel target. Fenomena penyerapan sinar oleh fotosensitizer merupakan proses fotofisika yang berlangsung saat molekul fotosensitizer yang memiliki konfigurasi elektron pada keadaan stabil (*ground state*) menyerap cahaya foton. Setelah menyerap cahaya, konfigurasi elektron molekul berubah menjadi tidak stabil (*excited state*). Dari *excited state*, elektron molekul fotosensitizer dapat kembali menjadi *ground state* apabila kehilangan energi atau menjadi *triplet state* apabila terus mendapatkan energi yang cukup. Pada *triplet state* ini merupakan keadaan yang reaktif, namun dalam keadaan ini terjadi interaksi secara kimiawi antara elektron dari molekul dengan oksigen yang memiliki konfigurasi elektron pada keadaan stabil. Karena adanya interaksi tersebut menyebabkan konfigurasi elektron dari molekul oksigen berada pada keadaan tereksitasi (tidak stabil). Oksigen tereksitasi cenderung akan berusaha ke kondisi elektron yang stabil, sehingga oksigen ini akan melakukan interaksi dengan sistem biologi disekitarnya. Interaksi yang terjadi antara oksigen tereksitasi dan sistem biologi seperti sel bakteri akan merusak sistem dan struktur sel tersebut. Hal tersebut menunjukkan pentingnya lama penyinaran untuk menghasilkan oksigen reaktif sehingga dapat menurunkan jumlah bakteri.^{12, 13, 14}

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perbedaan lama penyinaran *photodynamic therapy* (PDT) menggunakan sinar merah LED dan cairan fotosensitizer *Toluidine Blue O* (TBO) terhadap jumlah bakteri *E. nterococcus faecalis*.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Sampel penelitian yang dipakai pada penelitian ini adalah bakteri *E. nterococcus faecalis* ATCC 29212. Penentuan jumlah

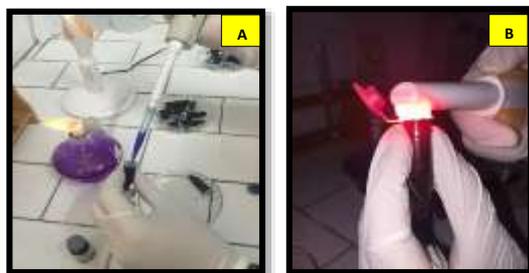
Commented [Office1]: Penelitian menggunakan bakteri, lebih baik menggunakan laik etik karena bakteri adalah makhluk hidup.

sampel yang digunakan pada penelitian ini menggunakan rumus Lemeshow *et al* 1990, didapatkan jumlah total sampel sebanyak 42. Sampel dibagi menjadi 7 kelompok, kelompok I (KI-K): merupakan kelompok kontrol tanpa penyinaran, kelompok II (KII-10): diberi penyinaran dengan PDT selama 10 detik, kelompok III (KIII-20): 20 detik, kelompok IV (KIV-30): 30 detik, kelompok V (KV-40): 40 detik, kelompok VI (KVI-50): 50 detik, kelompok VII (KVII-60): 60 detik.

Pembuatan kultur bakteri *Enterococcus faecalis* dilakukan dengan pengambilan sediaan kultur bakteri *Enterococcus faecalis* dengan kawat osse dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi *Brain Heart Infusion* (BHI) broth I. Kemudian diaduk dan diinkubasi (37°C) dalam inkubator (48 jam) dengan suasana anaerob (Forbes *et al.*, 2002). Kemudian, dari tabung BHI broth I tersebut diambil 0,5 ml dengan mikropipet untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi BHI broth II dan disetarakan dengan skala Mc Farland untuk mendapatkan suspensi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

Pembuatan sampel didapatkan dari tabung reaksi suspensi bakteri diambil 0,5 ml dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam masing – masing 42 tabung eppendorf. Tabung eppendorf tersebut sudah dilapisi dengan lakban hitam¹⁵ agar pada saat penyinaran, sinar PDT tidak diteruskan keluar dinding tabung. Sampel sebanyak 42 tabung eppendorf tersebut dikelompokkan menjadi 7 kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 6 buah tabung eppendorf.

Kelompok I merupakan kelompok kontrol (tanpa fotosensitizer dan tanpa penyinaran), hanya berisi sampel bakteri *Enterococcus faecalis*. Kelompok II diberi fotosensitizer berupa cairan Toluidine Blue O (TBO) sebanyak 0,5 ml dan ditunggu selama 60 detik, kemudian dilakukan penyinaran dengan sinar LED selama 10 detik. Untuk selanjutnya, kelompok III sampai kelompok VII diberi perlakuan seperti kelompok II dengan urutan lama penyinaran dengan sinar LED selama 20 detik, 30 detik, 40 detik, 50 detik dan 60 detik.^{10, 11}



Commented [Office2]: Lakukan sitasi sesuai dengan guideline

Gambar 1 (a) Pemberian 0,5 ml Fotosensitizer TBO ke Dalam Tabung Eppendorf yang Berisi 0,5 ml Bakteri *Enterococcus faecalis* (b) Penyinaran dengan sinar LED Sesuai dengan Kelompok Perlakuan

Setelah semua kelompok dilakukan penyinaran, masing – masing tabung eppendorf (kelompok I – VII) diambil 0,1 ml dengan mikropipet dan ditanam di petridish berisi nutrisi agar. Petridish berisi media nutrisi agar tersebut diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C dalam suasana anaerob.

Setelah diinkubasi, jumlah koloni bakteri pada petridish dihitung menggunakan *iebec Colony Counter* dengan metode *CFU* (*Colony Forming Unit* (*CFU*)) dan digunakan sebagai data setelah penyinaran untuk dianalisis data. ⁹

HASIL

Dari penghitungan statistik, didapatkan hasil rata-rata dan standar deviasi jumlah koloni bakteri *E. faecalis* setelah dilakukan penyinaran seperti tabel 1.

Tabel 1. Rerata dan Standar Deviasi Jumlah Koloni Bakteri *E. faecalis* Setelah Dilakukan Penyinaran

KELOMPOK	N	Mean	SD
KI K	6	116.67	4.67
KII 10	6	33.67	4.32
KIII 20	6	23.33	3.72
KIV 30	6	16.00	2.19
KV 40	6	12.50	2.73
KVI 50	6	.00	.000
KVII 60	6	.00	.000
Rata - rata	42	28.88	38.09

Commented [Office3]: Digabung menjadi satu kolom kemudian dilabel mean+/- SD

Dari hasil rerata setelah penyinaran dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan menunjukkan nilai $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa semua kelompok perhitungan mempunyai distribusi data yang normal. Kemudian data tersebut dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan uji statistik *Levene Test* dan didapatkan $p < 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa data pada ketujuh kelompok tidak mempunyai varians yang homogen.

Commented [Office4]: P uji shapiro-wilk berapa? Harap dituliskan

Setelah dilakukan uji normalitas dan homogenitas maka selanjutnya digunakan *Kruskal Wallis Test* untuk mengetahui perbedaan secara keseluruhan kelompok. Dari hasil uji didapatkan nilai $p < 0,05$. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan

Commented [Office5]: P uji Levene berapa? Harap dituliskan

bermakna antara jumlah koloni bakteri *E. ~~nterococcus~~ faecalis* pada seluruh kelompok perlakuan. Pada uji *Mann Whitney* memiliki syarat $p < 0,05$ untuk menunjukkan ada perbedaan bermakna pada tiap kelompok. Pada tabel tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara kelompok I (kontrol) dengan kelompok perlakuan yang lain (kelompok II, III, IV, V, VI, VII).

Commented [Office6]: P uji Kruskall walis berapa? Harap dituliskan

Tabel 2 Hasil Uji *Mann Whitney*

KELOMPOK	KI K	KII 10	KIII 20	KIV 30	KV 40	KVI 50	KVII 60
KI K	-	0.004*	0.004*	0.004*	0.004*	0.002*	0.002*
KII 10	-	-	0.004*	0.004*	0.004*	0.002*	0.002*
KIII 20	-	-	-	0.004*	0.004*	0.002*	0.002*
KIV 30	-	-	-	-	0.044*	0.002*	0.002*
KV 40	-	-	-	-	-	0.002*	0.002*
KVI 50	-	-	-	-	-	-	1.000
KVII 60	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : *) ada perbedaan bermakna

Pada tabel 2, tersebut sebagian besar p menunjukkan kurang dari 0,05 namun terdapat beberapa hasil yang menunjukkan bahwa $p > 0,05$ yaitu pada kelompok VI (50 detik) dibandingkan dengan VII (60 detik) yaitu sebesar 1,000 dan kelompok VII (60 detik) dibandingkan dengan VI (50 detik) yaitu sebesar 1,000. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok VI dan VII karena keduanya membunuh seluruh jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*.

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian rerata jumlah bakteri *E. ~~nterococcus~~ faecalis* setelah dilakukan penyinaran didapatkan perbedaan yang bermakna pada seluruh kelompok perlakuan (kontrol, 10 detik, 20 detik, 30 detik, 40 detik, 50 detik dan 60 detik). Hal ini berarti metode PDT dapat membunuh bakteri *E. ~~nterococcus~~ faecalis* secara signifikan sesuai dengan penelitian Rios (2011) yang menyebutkan bahwa PDT dengan kombinasi sinar LED dan cairan TBO memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* sehingga berpotensi untuk digunakan sebagai desinfeksi mikroba dalam perawatan endodontik konvensional. ¹⁶

Pada lama penyinaran 10 detik, 20 detik, 30 detik dan 40 detik masih terdapat jumlah bakteri *E. ~~nterococcus~~ faecalis* yang dihitung dengan ~~Colony Forming Unit~~CFU dengan rerata 33,67 ; 23,33 ; 16 dan 12,50. Hal ini tidak sesuai dengan penelitian Schlafer ~~(2010)~~ yang menunjukkan bahwa penggunaan fotosan selama 30 detik sesuai dengan protokol penggunaan untuk perawatan endodontik efektif menurunkan jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* ~~sebanyak (99,7 %)~~ dibandingkan dengan 10 detik dan 20 detik. Perbedaan hasil penelitian ini disebabkan oleh metode penelitian yang digunakan berbeda yaitu penggunaan ukuran tip fiber yang berbeda untuk penyinaran pada tabung eppendorf yang berisi suspensi bakteri. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa penggunaan ukuran tip fiber optikal memberikan hasil yang lebih baik dibanding sinar yang digunakan secara langsung pada kavitas gigi atau saluran akar karena semakin panjang **dan kecil** ukuran tip fiber dapat membantu memancarkan sinar dari PDT mencapai arah akses ujung apikal yang sulit dicapai. ^{9,10,17}

Pada kelompok lama penyinaran detik ke 50 dan 60 menunjukkan angka 0 yang berarti menunjukkan pada lama penyinaran 50 detik sudah cukup efektif untuk membunuh semua bakteri *Enterococcus faecalis*. Hal ini berlawanan dengan pendapat dari Poggio ~~(2011)~~ yang menunjukkan jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* berkurang pada lama penyinaran 90 detik ~~sebanyak (91,49%)~~ dibandingkan dengan 30 detik ~~sebanyak (87,72%)~~. Pemberian penyinaran Fotosan yang lebih lama secara signifikan dapat menurunkan persentase jumlah bakteri dibandingkan dengan pemberian penyinaran yang singkat. Perbedaan hasil penelitian tersebut disebabkan oleh perbedaan waktu perlakuan yang hanya membandingkan 30 detik dan 90 detik saja tetapi untuk detik ke-50 belum diteliti sedangkan pada penelitian ini diberi perlakuan lama penyinaran 10 sampai 60 detik dengan interval tiap 10 detik dan didapatkan hasil detik ke 50 bakteri *E. Enterococcus faecalis* sudah bersih. ¹¹

Penelitian ini menggunakan **metode photodynamic therapy** (PDT) untuk desinfeksi saluran akar dengan merk Fotosan. Fotosan menggunakan sinar merah LED dengan panjang gelombang 628 nm serta fotosensitizer TBO. Sesuai dengan penelitian Hopp ~~(2013)~~ yang menyatakan bahwa sinar merah dengan panjang gelombang 628 nm dapat mengaktivasi cairan TBO untuk menghasilkan singlet oksigen reaktif yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel bakteri. **Sinar tersebut** dapat mencapai kedalaman tubuli dentin akar yang sulit dijangkau oleh bahan desinfeksi irigasi yaitu hingga 0,5 cm – 1,5 cm serta memiliki derajat selektifan tinggi membunuh bakteri *E. ~~nterococcus~~ faecalis* tanpa merusak sel host. ^{13,18}

Fotosensitizer yang digunakan pada penelitian ini adalah ~~Toluidine Blue O~~ (TBO). Fotosensitizer TBO tersebut memiliki kandungan *phenothiazine*. *Phenothiazine* bersifat kation yang akan berikatan dengan dinding sel bakteri *E. ~~terrococcus~~ faecalis* yang bersifat anion. Dari ikatan tersebut akan terjadi interaksi elektrostatik sehingga meningkatkan permeabilitas dinding sel bakteri yang menyebabkan kation fotosensitizer tersebut lebih masuk ke membran sitoplasma bakteri sehingga dapat mendisorganisasi barrier permeabilitas lebih jauh. Dari penelitian Kikuchi_ ~~(2015)~~ TBO juga memiliki daya antibakteri karena dapat berinteraksi dengan lipopolisakarida membran sel bakteri walaupun tanpa dilakukan penyinaran. Ketika dilakukan penyinaran dengan panjang gelombang 630 nm akan terjadi penyerapan cairan fotosensitizer yang maksimal sehingga terjadi fotoaktivasi PDT untuk membunuh bakteri yang lebih baik dibandingkan dengan penggunaan cairan fotosensitizer tanpa penyinaran. Hal ini sesuai dengan pendapat Arneiro ~~(2014)~~ bahwa penggunaan TBO tanpa penyinaran jumlah bakteri yang mati lebih sedikit dibandingkan dengan penggunaan TBO dengan penyinaran.

19, 20

Sinar LED pada fotosan merupakan sinar merah dengan panjang gelombang 628 nm dengan *output power* 1000mW dan energi 30 J. Sinar tersebut akan menyebabkan terjadinya fenomena absorpsi sinar oleh fotosensitizer yang disebut dengan proses fotofisika. Fase pertama pada proses ini –adalah *ground state* yaitu pada fase ini setiap elektron masih dalam keadaan stabil dan berpasangan serta masih berada pada orbitalnya. Setelah diberikan penyinaran maka akan terjadi transfer energi yang menyebabkan **molekul elektron** fotosensitizer yang berada pada fase *ground state* berubah menjadi *excited state*. Pada fase ini elektron yang berpasangan mulai tidak stabil. Kemudian meningkat menjadi fase *triplet state* dimana elektron sudah terpisah dari pasangannya sehingga bersifat reaktif dan akan mencari pasangan dengan molekul lainnya. Pada *triplet state* ini merupakan keadaan yang reaktif, namun dalam keadaan ini terjadi interaksi secara kimiawi antara elektron dari molekul dengan oksigen yang memiliki konfigurasi elektron pada keadaan stabil. Karena adanya interaksi tersebut menyebabkan konfigurasi elektron dari molekul oksigen berada pada keadaan tereksitasi (tidak stabil). Oksigen tereksitasi cenderung akan berusaha ke kondisi elektron yang stabil, sehingga oksigen ini akan melakukan interaksi dengan sistem biologi disekitarnya. Interaksi yang terjadi antara oksigen tereksitasi dan sistem biologi seperti sel bakteri akan merusak sistem dan struktur sel tersebut. ^{12, 14}

Hasil dari interaksi tersebut akan menghasilkan dua tipe mekanisme. Pada tipe I terjadi transfer elektron antara fotosensitizer dengan substrat sehingga akan menghasilkan ion – ion radikal yang disebut dengan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang terdiri dari

superoksida anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikal ($\bullet OH$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Ion – ion tersebut bersifat oksidatif terhadap sel. Pada tipe II terjadi transfer elektron antara fotosensitizer dengan reseptor oksigen (O_2) yang akan menghasilkan singlet oksigen (1O_2). Singlet oksigen ini merupakan bentuk oksigen yang reaktif dan agen oksidatif yang kuat. ROS dan singlet oksigen tersebut akan menyebabkan kerusakan pada lisosom, mitokondria dan membran plasma bakteri. ⁴

Kerusakan tersebut terjadi karena ROS dan singlet oksigen menyebabkan stres oksidatif sehingga terjadi peroksidasi lipid pada membran plasma dan organel. Ikatan asam lemak dengan radikal bebas yang tidak stabil dapat menyebabkan kerusakan pada membran yang lebih parah, juga dapat menyebabkan oksidasi rantai asam amino, pembentukan ikatan kovalen protein – protein dan oksidasi protein. Hal ini akan menyebabkan kerusakan struktur protein, meningkatkan proteasomal degradasi protein. Selain itu dapat menyebabkan pemanjangan crosslinking rantai DNA, inaktivasi enzim NaDH *succinate* dan laktat dehidrogenase, merusak keseimbangan ion K^+ dan ion lainnya, serta dapat merusak DNA sel bakteri sehingga menyebabkan kematian pada bakteri. ^{4,14}

Dari hasil uji pada masing – masing kelompok, kelompok II (penyinaran 10 detik) merupakan kelompok yang memiliki kemampuan membunuh bakteri *E._nterococcus faecalis* yang paling sedikit. Hal ini disebabkan karena lama penyinaran yang kurang akan menyebabkan konsentrasi terbentuknya ion radikal dan singlet oksigen lebih sedikit sehingga jumlah bakteri yang mati menjadi kurang optimal. Pada kelompok VI (penyinaran 50 detik) dan kelompok VII (penyinaran 60 detik) memiliki kemampuan membunuh bakteri *E._nterococcus faecalis* yang paling baik. Pada kelompok VI jumlah bakteri sudah bersih sehingga dapat disimpulkan bahwa pada detik ke- 50 merupakan waktu efektif penyinaran PDT untuk membunuh semua jumlah bakteri *E._nterococcus faecalis*. Hal tersebut menunjukkan pentingnya lama penyinaran akan menghasilkan konsentrasi molekul fotosensitizer yang berada pada *ground (singlet) state*, *excited singlet state* dan *triplet state* yang cukup besar sehingga konsentrasi ion radikal dan singlet oksigen juga banyak. Konsentrasi ion radikal dan singlet oksigen yang banyak tersebut akan menyebabkan kerusakan pada adalah lisosom, mitokondria, dan membran plasma sel bakteri lebih besar dan sel bakteri yang mati jumlahnya lebih banyak. ^{12,14}

KESIMPULAN

Semakin lama penyinaran pada proses *photodynamic therapy* maka semakin sedikit jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*. Lama penyinaran 50 detik merupakan waktu yang paling efektif untuk membunuh seluruh jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*

DAFTAR PUSTAKA

1. Alagl AS, Bedi S, Almas K. Phytosolutions for *Enterococcus faecalis* in Endodontics: An Update. *OHDM*. 2016; 15(5): 332.
2. Pourhajibaghera M, Kazemianb H, Chiniforushd N, Hosseinie N, Pourakbarif B, Azizollahig A, et al. Exploring different photosensitizers to optimize elimination of planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis* from infected root canal during antimicrobial photodynamic therapy. *Journal Elsevier*. 2018; 24: 206-211.
3. Filipov I, Markova K, Boyadzhieva E. Efficacy of Photoactivated Disinfection on Experimental Biofilm – Scanning Electron Microscopy Results. *Journal of IMAB*. 2013; 19(4): 383-387.
4. Xhevdet A, Stubljar D, Kriznar I, Jukic T, Skvarc M, Veranic P, et al. The Disinfecting Efficacy of Root Canals with Laser Photodynamic Therapy. *J of Lasers in Med Sci*. 2014; 5(1): 19-26.
5. Lins CCSA, Melo ARS, Silva CC, Oliveira JB, Lima GA, Castro CCMB, et al. Photodynamic Therapy Application in Endodontic Aerobic Microorganisms and Facultative Anaerobic. *Formatex*. 2015; 2(1): 559-563.
6. Luis M, Marie T, Pezzlo. *Color Atlas of Medical Bacteriology*. 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press. 2013; 67-90.
7. Yildirim C, Karaarslan ES, Ozsevik S, Zer Y, Sari T, Usumez A. Antimicrobial Efficiency of Photodynamic Therapy with Different Irradiation Durations. *Eur J Dent*. 2013; 7(4): 469-473.
8. Jimenez L, Fusté M, Garriga A, Domínguez V, Viñas. Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(1): 1519–1526.
9. Bago I, Plecko V, Gabric PD, Schauer Z, Barabal A, Anic I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *International Endodontic Journal*. 2012; 4(2): 1-9.
10. Schlafer S, Vaeth M, Preben HB, Frandsen EVG. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source : an in vitro and ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(4): 634-641.
11. Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Florindi F, Chiesa M, Saino E, et al. Photoactivated disinfection (PAD) in endodontics: an in vitro microbiological evaluation. *Int J Artif Organs*. 2011; 34(9): 889-897.
12. Lestari ~~WP, Winda Puji~~. Potensi Inaktivasi *Streptococcus mutans* dengan Penambahan Fotosensitizer Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) pada Aplikasi Fotodinamik Light Emitting Diode (LED). Skripsi. Departemen Fisika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. 2017.
13. Kishen A, Shrestha A. Photodynamic Therapy for Root Canal Disinfection. *Endodontic Irrigation*. 2015; 14(1): 231-252.
14. Dai, Tianhong, Beth B. Fuchs, Jeffrey J. Coleman, Renato A. Prates, Christos Astrakas, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in Microbiology*. 2012; 3(120): 1-16.

Commented [Office7]: Singkatan dari apa harap ditambahkan

15. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Laboratory Methods for Detection of Antibacterial Resistance. Balley & Scott's Diagnostic Microbiology 8th ed. Mosby Inc. St. Louis. Philadelphia. 2002; 478.
16. Rios A, He J, Glickman G, Spears R, Schneiderman E, Honeyman A. Evaluation of Photodynamic Therapy Using a Light- emitting Diode Lamp against *Enterococcus faecalis* in Extracted Human Teeth. *Journal of Endodontic*. 2011; 37(6): 856-859.
17. Garcez AS, Fregnani ER, Rodriguez HM, Nunez SC, Sabino CP, Suzuki H. The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant?. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(1): 79–85.
18. Hopp M, Biffar R. Photodynamic therapies blue versus green. Germany: Greifswald University. 2013; 10-25.
19. Kikuchi T, Mogi M, Okabe I, Okada K, Goto H, Sasaki Y, et al. Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in nonsurgical periodontal treatment : a review of literature. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(3) : 24111 – 24126.
20. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobactericidal Efficacy Against Gram-Positive and Gram-Negative Microorganisms. *Lasers in Surg Med*. 2001; 29(2): 165-173.

Commented [Office8]: Akan lebih baik apabila diganti dengan referensi 10 tahun terakhir dari jurnal internasional.

"Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)" <dental_journal@fkg.unair.ac.id>

Pemberitahuan koreksi ke-4 naskah

To: Nanik Zubaidah <nanik-z@fkg.unair.ac.id>, nanikzubaidah@yahoo.com

Kepada Yth.

Nanik Zubaidah, drg., M.Kes., Sp.KG(K)

Departemen Konservasi Gigi

Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Airlangga

Kami beritahukan bahwa naskah sejawat dengan judul :

Efektifitas Lama Penyinaran LED Pada *Photodynamic Therapy* Terhadap Penurunan Jumlah Bakteri *Enterococcus Faecalis*

Authors: Dinda Dewi Artini¹, Nanik Zubaidah², Agus Subiwahjudi³, Karina Erda Saninggar⁴

telah kami telaah melalui tinjauan Penyunting Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi). Agar naskah tersebut dapat kami proses lebih lanjut, sejawat dimohon melakukan perbaikan sesuai dengan catatan penyunting yang tertulis pada naskah.

Hasil perbaikan naskah mohon diberi tanda seperti pada contoh tabel revisi (terlampir) dan dikirim kembali ke alamat E-mail: dental_journal@fkg.unair.ac.id selambat-lambatnya tanggal **26 Maret 2020**. Apabila sampai batas waktu yang kami tentukan penulis belum mengirimkan kembali revisi naskah tersebut sesuai dengan masukan yang diberikan oleh Penyunting, maka kami anggap penulis telah **membatalkan** artikel tersebut untuk diterbitkan pada Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi). Penentuan penerimaan naskah berdasarkan hasil revisi yang dikirimkan.

Atas perhatiannya, kami ucapkan terima kasih.

Hormat Kami,

Ketua Penyunting Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)

Saka Winias, drg., M.Kes., Sp.PM

NIP. 199005152014042000

Efektifitas Lama Penyinaran **Light Emitting Diode pada *Photodynamic Therapy*
Terhadap Penurunan Jumlah Bakteri *Enterococcus Faecalis*: **In Vitro Study****

ABSTRAK

Latar belakang: Keberhasilan dari perawatan saluran akar adalah dapat mengeliminasi bakteri patogen dari saluran akar yang terinfeksi. Bakteri yang paling sering dapat menyebabkan infeksi saluran akar adalah *Enterococcus faecalis* karena bakteri tersebut resisten terhadap medikamen dan irigasi saluran akar. Photodynamic therapy (PDT) merupakan suatu metode desinfeksi saluran akar menggunakan kombinasi cairan fotosensitizer dan sinar aktivasi untuk mengeliminasi bakteri pada saluran akar. Lama penyinaran PDT dapat mempengaruhi produksi singlet oksigen dan Reactive Oxygen Species (ROS) untuk mengeliminasi bakteri *E. faecalis*. **Tujuan:** Untuk menganalisis perbedaan lama penyinaran photodynamic therapy terhadap jumlah bakteri *E. faecalis*. **Metode:** Penelitian ini menggunakan kultur bakteri *E. faecalis* yang terbagi dalam 7 kelompok tabung eppendorf. Kelompok I sebagai kelompok kontrol, kelompok II, III, IV, V, VI dan VII diberi fotosensitizer Toluidine Blue O (TBO) dan diberi perbedaan lama penyinaran 10, 20, 30, 40, 50 dan 60 detik. Setelah diinkubasi, jumlah bakteri dihitung dengan Quebec Colony Counter dan dianalisis dengan Kruskal Wallis test dan Mann Whitney test ($p < 0.05$). **Hasil:** Terdapat perbedaan signifikan antara jumlah koloni bakteri *E. faecalis* pada tiap kelompok perlakuan ($p < 0.05$). Lama penyinaran PDT yang lebih lama yakni kelompok VI dan VII menunjukkan jumlah bakteri *E. faecalis* yang lebih sedikit. **Kesimpulan:** Semakin lama penyinaran PDT maka semakin sedikit jumlah bakteri *E. faecalis*. Lama penyinaran 50 detik merupakan waktu yang paling efektif untuk membunuh seluruh jumlah bakteri *E. faecalis*.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, Irradiation Time, **Light Emitting Diode**, Photodynamic therapy, Root Canal Treatment

PENDAHULUAN

Infeksi endodontik terjadi akibat adanya invasi beberapa bakteri pada saluran akar. *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri patogen yang paling banyak ditemukan pada saluran akar (4-40%) dan menyebabkan 20-70% kegagalan perawatan endodontik.^{1,2} Pada beberapa penelitian, *Enterococcus faecalis* banyak ditemukan di dalam saluran akar yang telah dilakukan perawatan saluran akar, karena bakteri tersebut resisten terhadap beberapa medikamen dan bahan irigasi antimikroba selama perawatan saluran akar.^{3,4,5} Di dalam

tubulus dentin, *E. faecalis* dapat bertahan dari medikamen intrakanal kalsium hidroksida (Ca(OH)_2) sampai lebih dari 10 hari.⁶

Eliminasi bakteri patogen yang ada dalam saluran akar dapat mempengaruhi keberhasilan perawatan saluran akar. Struktur dan bentuk saluran akar yang kompleks merupakan masalah utama dalam pembersihan saluran akar untuk mengeliminasi bakteri patogen tersebut. Bakteri yang tertinggal di dalam saluran akar dapat berpenetrasi pada tubuli dentin akar hingga kedalaman 1000 μm , sedangkan bahan desinfeksi irigasi hanya mencapai kedalaman 100 μm .^{4, 5, 7}

Pada beberapa dekade terakhir dikembangkan *photodynamic therapy* (PDT), yaitu metode desinfeksi menggunakan sinar cahaya (*light activated disinfection*) dengan panjang gelombang tertentu, yang terdiri dari dua komponen yaitu sumber sinar cahaya berupa *Light Emitting Diode* (LED) atau laser diode sebagai fotoaktivasi, dan cairan fotosensitizer yang dapat menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri. Molekul cairan fotosensitizer tersebut diaktifkan dengan sumber cahaya sehingga reaksi tersebut menghasilkan singlet oksigen reaktif yang memiliki efek sitotoksik dan dapat merusak struktur sel bakteri. Penggunaan PDT setelah preparasi mekanis dan irigasi secara kimiawi dapat mengeliminasi bakteri patogen dalam saluran akar secara efektif. Sinar cahaya PDT tersebut dapat menjangkau area saluran akar yang sulit dijangkau dengan irigasi konvensional karena sinar ini dapat mencapai kedalaman 0.5 cm – 1.5 cm tubuli dentin akar. Selain itu, sinar tersebut tidak memiliki kandungan toksik dan memiliki derajat selektivitas yang tinggi untuk membunuh bakteri melalui reaksi dengan cairan fotosensitizer dan oksigen tanpa merusak sel host. Pada studi *in vivo* dilaporkan bahwa PDT efektif mengeliminasi bakteri yang resisten terhadap beberapa jenis medikamen. Berdasarkan hasil penelitian yang menggunakan PDT berupa Fotosan dapat membunuh bakteri gram positif dan negatif, seperti *Streptococcus mutans* dan *E. faecalis*.^{8, 9}

Fotosan merupakan *photodynamic therapy* yang menggunakan sinar merah LED *Light Emitting Diode* (LED) dengan panjang gelombang 630 nm serta cairan fotosensitizer *Toluidine Blue O* (TBO). Menurut protokol penggunaan fotosan untuk perawatan endodontik, fotosensitizer dimasukkan ke dalam saluran akar selama 60 detik agar cairan tersebut kontak dengan dinding saluran akar. Kemudian, endodontik tip dari alat tersebut dimasukkan ke dalam saluran akar dan disinari selama 30 detik. Hal ini sesuai dengan penelitian Schlafer yang menunjukkan bahwa penggunaan fotosan selama 30 detik dapat menurunkan jumlah mikroorganisme patogen penyebab infeksi endodontik (*Escherichia coli*, *E. faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus intermedius*) dibandingkan dengan 10 detik dan 20 detik secara *in vitro* dan *ex vivo*. Namun, penelitian Poggio

didapatkan penurunan jumlah bakteri *E. faecalis*, *S. mutans* dan *Streptococcus sanguin* pada waktu penyinaran yang lebih lama yaitu 90 detik. Selain itu dari penelitian Xhevdet *et al.* mengenai PDT didapatkan hasil waktu penyinaran pada bakteri *E. faecalis* selama 5 menit memiliki efek yang lebih besar dibandingkan penyinaran selama 1 menit dan 3 menit namun tidak memiliki perbedaan yang signifikan antara lama penyinaran dengan berkurangnya jumlah bakteri.^{4, 10, 11}

Keefektifan PDT tergantung pada tingkat kekuatan, durasi, penyerapan dari sinar pada jaringan, geometri dari saluran akar dan jarak ujung alat ke sel target. Fenomena penyerapan sinar oleh fotosensitizer merupakan proses fotofisika yang berlangsung saat molekul fotosensitizer yang memiliki konfigurasi elektron pada keadaan stabil (*ground state*) menyerap cahaya foton. Setelah menyerap cahaya, konfigurasi elektron molekul berubah menjadi tidak stabil (*excited state*). Dari *excited state*, elektron molekul fotosensitizer dapat kembali menjadi *ground state* apabila kehilangan energi atau menjadi *triplet state* apabila terus mendapatkan energi yang cukup. Pada *triplet state* ini merupakan keadaan yang reaktif, namun dalam keadaan ini terjadi interaksi secara kimiawi antara elektron dari molekul dengan oksigen yang memiliki konfigurasi elektron pada keadaan stabil. Karena adanya interaksi tersebut menyebabkan konfigurasi elektron dari molekul oksigen berada pada keadaan tereksitasi (tidak stabil). Oksigen tereksitasi cenderung akan berusaha ke kondisi elektron yang stabil, sehingga oksigen ini akan melakukan interaksi dengan sistem biologi disekitarnya. Interaksi yang terjadi antara oksigen tereksitasi dan sistem biologi seperti sel bakteri akan merusak sistem dan struktur sel tersebut. Hal tersebut menunjukkan pentingnya lama penyinaran untuk menghasilkan oksigen reaktif sehingga dapat menurunkan jumlah bakteri.^{12, 13, 14}

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis perbedaan lama penyinaran PDT menggunakan sinar merah LED dan cairan fotosensitizer TBO terhadap jumlah bakteri *E. faecalis*.

BAHAN DAN METODE

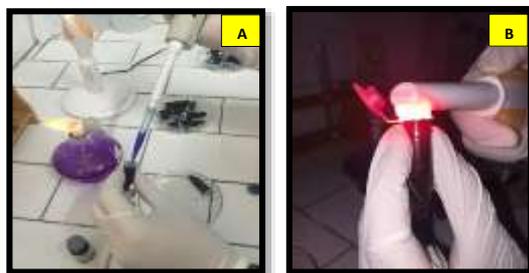
Penelitian ini telah disetujui oleh komite etika Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dengan nomor referensi 160/HRECC.FODM/VIII/2017. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Sampel penelitian yang dipakai pada penelitian ini adalah bakteri *E. faecalis* ATCC 29212. Penentuan jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini menggunakan rumus Lemeshow *et al* 1990, didapatkan jumlah total sampel sebanyak 42. Sampel dibagi menjadi 7 kelompok, kelompok I (KI-K): merupakan kelompok kontrol

tanpa penyinaran, kelompok II (KII-10): diberi penyinaran dengan PDT selama 10 detik, kelompok III (KIII-20): 20 detik, kelompok IV (KIV-30): 30 detik, kelompok V (KV-40): 40 detik, kelompok VI (KVI-50): 50 detik, kelompok VII (KVII-60): 60 detik.

Pembuatan kultur bakteri *E. faecalis* dilakukan dengan pengambilan sediaan kultur bakteri *E. faecalis* dengan kawat osse dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi *Brain Heart Infusion* (BHI) broth I. Kemudian diaduk dan diinkubasi (37°C) dalam inkubator (48 jam) dengan suasana anaerob.¹⁵ Kemudian, dari tabung BHI broth I tersebut diambil 0,5 ml dengan mikropipet untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi BHI broth II dan disetarakan dengan skala Mc Farland untuk mendapatkan suspensi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

Pembuatan sampel didapatkan dari tabung reaksi suspensi bakteri diambil 0,5 ml dengan mikropipet dan dimasukkan ke dalam masing – masing 42 tabung eppendorf. Tabung eppendorf tersebut sudah dilapisi dengan lakban hitam¹⁵ agar pada saat penyinaran, sinar PDT tidak diteruskan keluar dinding tabung. Sampel sebanyak 42 tabung eppendorf tersebut dikelompokkan menjadi 7 kelompok. Setiap kelompok terdiri dari 6 buah tabung eppendorf.

Kelompok I merupakan kelompok kontrol (tanpa fotosensitizer dan tanpa penyinaran), hanya berisi sampel bakteri *Enterococcus faecalis*. Kelompok II diberi fotosensitizer berupa cairan Toluidine Blue O (TBO) sebanyak 0,5 ml dan ditunggu selama 60 detik, kemudian dilakukan penyinaran dengan sinar LED selama 10 detik. Untuk selanjutnya, kelompok III sampai kelompok VII diberi perlakuan seperti kelompok II dengan urutan lama penyinaran dengan sinar LED selama 20 detik, 30 detik, 40 detik, 50 detik dan 60 detik.^{10, 11}



Gambar 1 (a) Pemberian 0,5 ml Fotosensitizer TBO ke Dalam Tabung Eppendorf yang Berisi 0,5 ml Bakteri *Enterococcus faecalis* (b) Penyinaran dengan sinar LED Sesuai dengan Kelompok Perlakuan

Setelah semua kelompok dilakukan penyinaran, masing – masing tabung eppendorf (kelompok I – VII) diambil 0.1 ml dengan mikropipet dan ditanam di petridish

berisi nutrisi agar. Petridish berisi media nutrisi agar tersebut diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C dalam suasana anaerob.

Setelah diinkubasi, jumlah koloni bakteri pada petridish dihitung menggunakan *iuebec Colony Counter* dengan metode *Colony Forming Unit (CFU)* dan digunakan sebagai data setelah penyinaran untuk dianalisis data.⁹

HASIL

Dari penghitungan statistik, didapatkan hasil rata-rata dan standar deviasi jumlah koloni bakteri *E. faecalis* setelah dilakukan penyinaran seperti tabel 1.

Tabel 1. Rerata dan Standar Deviasi Jumlah Koloni *E. faecalis* setelah dilakukan Penyinaran

KELOMPOK	N	Mean
KI K	6	116.67 ± 4.67
KII 10	6	33.67 ± 4.32
KIII 20	6	23.33 ± 3.72
KIV 30	6	16.00 ± 2.19
KV 40	6	12.50 ± 2.73
KVI 50	6	.00 ± .000
KVII 60	6	.00 ± .000
Rata - rata	42	28.88 ± 38.09

Dari hasil rerata setelah penyinaran, dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan didapatkan nilai sig atau $p > 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa semua kelompok perhitungan mempunyai distribusi data yang normal.

Tabel 2. Hasil Uji *Shapiro-Wilk*

Kelompok	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig
Kontrol	.971	6	.896
10 Detik	.801	6	.060
20 Detik	.824	6	.096
30 Detik	.955	6	.783
40 Detik	.897	6	.357

- a. Lilliefors Significance Correction
 b. After is constant when Kelompok = 50 Detik. It has been omitted.
 c. After is constant when Kelompok = 60 Detik. It has been omitted.

Kemudian data tersebut dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan uji statistik *Levene Test* dan didapatkan nilai signifikansi homogenitas 0.007 ($p < 0.05$) dengan

Levene Statistic 3.640. Hal ini menunjukkan bahwa data pada ketujuh kelompok tidak mempunyai varians yang homogen.

Setelah dilakukan uji normalitas dan homogenitas maka selanjutnya digunakan *Kruskal Wallis Test* untuk mengetahui perbedaan secara keseluruhan kelompok. Dari hasil uji didapatkan nilai signifikansi 0.000 ($p < 0.05$) untuk chi-square 40.038. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara jumlah koloni bakteri *E. Faecalis* pada seluruh kelompok perlakuan.

Pada uji *Mann Whitney* memiliki syarat $p < 0.05$ untuk menunjukkan ada perbedaan bermakna pada tiap kelompok. Pada tabel di bawah ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara kelompok I (kontrol) dengan kelompok perlakuan yang lain (kelompok II, III, IV, V, VI, VII).

Tabel 3. Hasil Uji *Mann Whitney*

KELOMPOK	KI K	KII 10	KIII 20	KIV 30	KV 40	KVI 50	KVII 60
KI K	-	0.004*	0.004*	0.004*	0.004*	0.002*	0.002*
KII 10	-	-	0.004*	0.004*	0.004*	0.002*	0.002*
KIII 20	-	-	-	0.004*	0.004*	0.002*	0.002*
KIV 30	-	-	-	-	0.044*	0.002*	0.002*
KV 40	-	-	-	-	-	0.002*	0.002*
KVI 50	-	-	-	-	-	-	1.000
KVII 60	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan : *) ada perbedaan bermakna

Pada tabel 3, sebagian besar p menunjukkan kurang dari 0.05 namun terdapat beberapa hasil yang menunjukkan bahwa $p > 0.05$ yaitu pada kelompok VI (50 detik) dibandingkan dengan VII (60 detik) yaitu sebesar 1.000 dan kelompok VII (60 detik) dibandingkan dengan VI (50 detik) yaitu sebesar 1.000. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara kelompok VI dan VII karena keduanya membunuh seluruh jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*.

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian rerata jumlah bakteri *E. faecalis* setelah dilakukan penyinaran didapatkan perbedaan yang bermakna pada seluruh kelompok perlakuan (kontrol, 10 detik, 20 detik, 30 detik, 40 detik, 50 detik dan 60 detik). Hal ini berarti metode PDT dapat membunuh bakteri *E. faecalis* secara signifikan sesuai dengan penelitian Rios yang menyebutkan bahwa PDT dengan kombinasi sinar LED dan cairan TBO memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *E. faecalis* sehingga berpotensi untuk digunakan sebagai desinfeksi mikroba dalam perawatan endodontik konvensional.¹⁶

Pada lama penyinaran 10 detik, 20 detik, 30 detik dan 40 detik masih terdapat jumlah bakteri *E. faecalis* yang dihitung dengan CFU dengan rerata 33.67; 23.33 ; 16 dan 12.50. Hal ini tidak sesuai dengan penelitian Schlafer yang menunjukkan bahwa penggunaan fotosan selama 30 detik sesuai dengan protokol penggunaan untuk perawatan endodontik efektif menurunkan jumlah bakteri *E. faecalis* sebanyak 99.7 % dibandingkan dengan 10 detik dan 20 detik. Perbedaan hasil penelitian ini disebabkan oleh metode penelitian yang digunakan berbeda yaitu penggunaan ukuran tip fiber yang berbeda untuk penyinaran pada tabung eppendorf yang berisi suspensi bakteri. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa penggunaan ukuran tip fiber optikal memberikan hasil yang lebih baik dibanding sinar yang digunakan secara langsung pada kavitas gigi atau saluran akar karena semakin panjang dan kecil ukuran tip fiber dapat membantu memancarkan sinar dari PDT mencapai arah akses ujung apikal yang sulit dicapai.^{9, 10, 17}

Pada kelompok lama penyinaran detik ke 50 dan 60 menunjukkan angka 0 yang berarti menunjukkan pada lama penyinaran 50 detik sudah cukup efektif untuk membunuh semua bakteri *E. faecalis*. Hal ini berlawanan dengan pendapat dari Poggio yang menunjukkan jumlah bakteri *Enterococcus faecalis* berkurang pada lama penyinaran 90 detik sebanyak 91,49%) dibandingkan dengan 30 detik sebanyak 87,72%. Pemberian penyinaran Fotosan yang lebih lama secara signifikan dapat menurunkan persentase jumlah bakteri dibandingkan dengan pemberian penyinaran yang singkat. Perbedaan hasil penelitian tersebut disebabkan oleh perbedaan waktu perlakuan yang hanya membandingkan 30 detik dan 90 detik saja tetapi untuk detik ke-50 belum diteliti sedangkan pada penelitian ini diberi perlakuan lama penyinaran 10 sampai 60 detik dengan interval tiap 10 detik dan didapatkan hasil detik ke 50 bakteri *E. faecalis* sudah bersih.¹¹

Penelitian ini menggunakan metode PDT untuk desinfeksi saluran akar dengan merk Fotosan. Fotosan menggunakan sinar merah LED dengan panjang gelombang 628 nm serta fotosensitizer TBO. Sesuai dengan penelitian Hopp yang menyatakan bahwa sinar

merah dengan panjang gelombang 628 nm dapat mengaktivasi cairan TBO untuk menghasilkan singlet oksigen reaktif yang menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel bakteri. Sinar tersebut dapat mencapai kedalaman tubuli dentin akar yang sulit dijangkau oleh bahan desinfeksi irigasi yaitu hingga 0.5 cm – 1.5 cm serta memiliki derajat selektivitas tinggi membunuh bakteri *E. faecalis* tanpa merusak sel host.^{13,18}

Fotosensitizer yang digunakan pada penelitian ini adalah TBO. Fotosensitizer TBO tersebut memiliki kandungan *phenothiazine*. *Phenothiazine* bersifat kation yang akan berikatan dengan dinding sel bakteri *E. faecalis* yang bersifat anion. Dari ikatan tersebut akan terjadi interaksi elektrostatis sehingga meningkatkan permeabilitas dinding sel bakteri yang menyebabkan kation fotosensitizer tersebut lebih masuk ke membran sitoplasma bakteri sehingga dapat mendisorganisasi barrier permeabilitas lebih jauh. Dari penelitian Kikuchi, TBO juga memiliki daya antibakteri karena dapat berinteraksi dengan lipopolisakarida membran sel bakteri walaupun tanpa dilakukan penyinaran. Ketika dilakukan penyinaran dengan panjang gelombang 630 nm akan terjadi penyerapan cairan fotosensitizer yang maksimal sehingga terjadi fotoinaktivasi PDT untuk membunuh bakteri yang lebih baik dibandingkan dengan penggunaan cairan fotosensitizer tanpa penyinaran. Hal ini sesuai dengan pendapat Arneiro bahwa penggunaan TBO tanpa penyinaran jumlah bakteri yang mati lebih sedikit dibandingkan dengan penggunaan TBO dengan penyinaran.^{19,20}

Sinar LED pada fotosan merupakan sinar merah dengan panjang gelombang 628 nm dengan *output power* 1000mW dan energi 30 J. Sinar tersebut akan menyebabkan terjadinya fenomena absorpsi sinar oleh fotosensitizer yang disebut dengan proses fotofisika. Fase pertama pada proses ini adalah *ground state* yaitu pada fase ini setiap elektron masih dalam keadaan stabil dan berpasangan serta masih berada pada orbitalnya. Setelah diberikan penyinaran maka akan terjadi transfer energi yang menyebabkan molekul elektron fotosensitizer yang berada pada fase *ground state* berubah menjadi *excited state*. Pada fase ini elektron yang berpasangan mulai tidak stabil. Kemudian meningkat menjadi fase *triplet state* dimana elektron sudah terpisah dari pasangannya sehingga bersifat reaktif dan akan mencari pasangan dengan molekul lainnya. Pada *triplet state* ini merupakan keadaan yang reaktif, namun dalam keadaan ini terjadi interaksi secara kimiawi antara elektron dari molekul dengan oksigen yang memiliki konfigurasi elektron pada keadaan stabil. Karena adanya interaksi tersebut menyebabkan konfigurasi elektron dari molekul oksigen berada pada keadaan tereksitasi (tidak stabil). Oksigen tereksitasi cenderung akan berusaha ke kondisi elektron yang stabil, sehingga oksigen ini akan melakukan interaksi

dengan sistem biologi disekitarnya. Interaksi yang terjadi antara oksigen tereksitasi dan sistem biologi seperti sel bakteri akan merusak sistem dan struktur sel tersebut.^{12,14}

Hasil dari interaksi tersebut akan menghasilkan dua tipe mekanisme. Pada tipe I terjadi transfer elektron antara fotosensitizer dengan substrat sehingga akan menghasilkan ion – ion radikal yang disebut dengan ROS yang terdiri dari superoksida anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikal ($\bullet OH$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). Ion – ion tersebut bersifat oksidatif terhadap sel. Pada tipe II terjadi transfer elektron antara fotosensitizer dengan reseptor oksigen (O_2) yang akan menghasilkan singlet oksigen (1O_2). Singlet oksigen ini merupakan bentuk oksigen yang reaktif dan agen oksidatif yang kuat. ROS dan singlet oksigen tersebut akan menyebabkan kerusakan pada lisosom, mitokondria dan membran plasma bakteri.¹⁴

Kerusakan tersebut terjadi karena ROS dan singlet oksigen menyebabkan stres oksidatif sehingga terjadi peroksidasi lipid pada membran plasma dan organel. Ikatan asam lemak dengan radikal bebas yang tidak stabil dapat menyebabkan kerusakan pada membran yang lebih parah, juga dapat menyebabkan oksidasi rantai asam amino, pembentukan ikatan kovalen protein – protein dan oksidasi protein. Hal ini akan menyebabkan kerusakan struktur protein, meningkatkan proteasomal degradasi protein. Selain itu dapat menyebabkan pemanjangan crosslinking rantai DNA, inaktivasi enzim NaDH *succinate* dan laktat dehidrogenase, merusak keseimbangan ion K^+ dan ion lainnya, serta dapat merusak DNA sel bakteri sehingga menyebabkan kematian pada bakteri.^{4,14}

Dari hasil uji pada masing – masing kelompok, kelompok II (penyinaran 10 detik) merupakan kelompok yang memiliki kemampuan membunuh bakteri *E. faecalis* yang paling sedikit. Hal ini disebabkan karena lama penyinaran yang kurang akan menyebabkan konsentrasi terbentuknya ion radikal dan singlet oksigen lebih sedikit sehingga jumlah bakteri yang mati menjadi kurang optimal. Pada kelompok VI (penyinaran 50 detik) dan kelompok VII (penyinaran 60 detik) memiliki kemampuan membunuh bakteri *E. faecalis* yang paling baik. Pada kelompok VI jumlah bakteri sudah bersih sehingga dapat disimpulkan bahwa pada detik ke- 50 merupakan waktu efektif penyinaran PDT untuk membunuh semua jumlah bakteri *E. faecalis*. Hal tersebut menunjukkan pentingnya lama penyinaran akan menghasilkan konsentrasi molekul fotosensitizer yang berada pada *ground (singlet) state*, *excited singlet state* dan *triplet state* yang cukup besar sehingga konsentrasi ion radikal dan singlet oksigen juga banyak. Konsentrasi ion radikal dan singlet oksigen yang banyak tersebut akan menyebabkan kerusakan pada adalah lisosom, mitokondria, dan membran plasma sel bakteri lebih besar dan sel bakteri yang mati jumlahnya lebih banyak.^{12,14}

KESIMPULAN

Semakin lama penyinaran pada proses *photodynamic therapy* maka semakin sedikit jumlah bakteri *Enterococcus faecalis*. Lama penyinaran 50 detik merupakan waktu yang paling efektif untuk membunuh seluruh jumlah bakteri *E. faecalis*

DAFTAR PUSTAKA

1. Alagl AS, Bedi S, Almas K. Phytosolutions for *Enterococcus faecalis* in Endodontics: An Update. *Oral Health and Dental Management Journal*. 2016; 15(5): 332.
2. Pourhajibaghera M, Kazemianb H, Chiniforushd N, Hosseinie N, Pourakbarif B, Azizollahig A, et al. Exploring different photosensitizers to optimize elimination of planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis* from infected root canal during antimicrobial photodynamic therapy. *Journal Elsevier*. 2018; 24: 206-211.
3. Filipov I, Markova K, Boyadzhieva E. Efficency of Photoactivated Disinfection on Experimental Biofilm – Scanning Electron Microscopy Results. *Journal of IMAB*. 2013; 19(4): 383-387.
4. Xhevdet A, Stubljarić D, Kriznar I, Jukić T, Skvarc M, Veranić P, et al. The Disinfecting Efficacy of Root Canals with Laser Photodynamic Therapy. *J of Lasers in Med Sci*. 2014; 5(1): 19-26.
5. Lins CCSA, Melo ARS, Silva CC, Oliveira JB, Lima GA, Castro CCMB, et al. Photodynamic Therapy Application in Endodontic Aerobic Microorganisms and Facultative Anaerobic. *Formatex*. 2015; 2(1): 559-563.
6. Luis M, Marie T, Pezzlo. *Color Atlas of Medical Bacteriology*. 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press. 2013; 67-90.
7. Yildirim C, Karaarslan ES, Ozsevik S, Zer Y, Sari T, Usumez A. Antimicrobial Efficiency of Photodynamic Therapy with Different Irradiation Durations. *Eur J Dent*. 2013; 7(4): 469-473.
8. Jimenez L, Fusté M, Garriga A, Domínguez V, Viñas. Effects of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(1): 1519–1526.
9. Bago I, Plecko V, Gabric PD, Schauer Z, Barabai A, Anic I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *International Endodontic Journal*. 2012; 4(2): 1-9.
10. Schlafer S, Vaeth M, Preben HB, Frandsen EVG. Endodontic photoactivated disinfection using a conventional light source : an in vitro and ex vivo study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(4): 634-641.
11. Poggio C, Arciola CR, Dagna A, Florindi F, Chiesa M, Saino E, et al. Photoactivated disinfection (PAD) in endodontics: an in vitro microbiological evaluation. *Int J Artif Organs*. 2011; 34(9): 889-897.
12. Lestari WP. Potensi Inaktivasi *Streptococcus mutans* dengan Penambahan Fotosensitizer Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) pada Aplikasi Fotodinamik Light Emitting Diode (LED). Skripsi. Departemen Fisika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. 2017.
13. Kishen A, Shrestha A. Photodynamic Therapy for Root Canal Disinfection. *Endodontic Irrigation*. 2015; 14(1): 231-252.

Commented [Office1]: Referensi mohon sebaiknya diganti/diperbaiki dengan referensi terbaru setidaknya 2-3 referensi tahun 2018-2020.

14. Dai, Tianhong, Beth B. Fuchs, Jeffrey J. Coleman, Renato A. Prates, Christos Astrakas, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. *Frontiers in Microbiology*. 2012; 3(120): 1-16.
15. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Laboratory Methods for Detection of Antibacterial Resistance*. Balley & Scott's Diagnostic Microbiology 8th ed. Mosby Inc. St. Louis, Philadelphia. 2002; 478.
16. Rios A, He J, Glickman G, Spears R, Schneiderman E, Honeyman A. Evaluation of Photodynamic Therapy Using a Light- emitting Diode Lamp against *Enterococcus faecalis* in Extracted Human Teeth. *Journal of Endodontic*. 2011; 37(6): 856-859.
17. Garcez AS, Fregnani ER, Rodriguez HM, Nunez SC, Sabino CP, Suzuki H. The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant?. *Lasers Med Sci*. 2013; 28(1): 79-85.
18. Hopp M, Biffar R. *Photodynamic therapies blue versus green*. Germany: Greifswald University. 2013; 10-25.
19. Kikuchi T, Mogi M, Okabe I, Okada K, Goto H, Sasaki Y, et al. Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in nonsurgical periodontal treatment : a review of literature. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(3) : 24111 – 24126.
20. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobactericidal Efficacy Against Gram-Positive and Gram-Negative Microorganisms. *Lasers in Surg Med*. 2001; 29(2): 165-173.