

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Karies gigi merupakan penyakit multifaktorial yang dapat mempengaruhi kerusakan jaringan pulpa, secara progresif menginflamasi jaringan pulpa, dan dapat menurunkan vitalitasnya (Koç & Del Fabbro, 2020). Terjadinya karies gigi disebabkan oleh infiltrasi bakteri kariogenik, kondisi lokal, serta respon *host* (Oh *et al.*, 2020). Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar atau Riskesdas pada tahun 2018, sebanyak 57,6% penduduk Indonesia memiliki permasalahan gigi dan mulut, namun hanya 10,2% dirawat oleh tenaga medis gigi. Masalah terbesar penyakit gigi dan mulut menurut data Riskesdas 2018 adalah gigi rusak atau berlubang, dengan prevalensi karies sebesar 88,8% dan prevalensi karies akar sebesar 56,6%. Apabila karies tidak segera diobati, karies akan berkembang menjadi pulpitis dan akhirnya infeksi pulpa dan terjadi kematian sel pulpa (Bjørndal *et al.*, 2019).

Jaringan pulpa merupakan suatu jaringan ikat yang teravaskularisasi dan terinervasi, berasal dari jaringan mesenkim, letaknya berada bagian tengah ruang pulpa hingga saluran akar dan apeks (Galler *et al.*, 2021). Jaringan pulpa memiliki fungsi sebagai penyedia nutrisi bagi sel odontoblas, proteksi terhadap kerusakan dengan respon reparatif, serta memberikan respon imun terhadap infeksi (Berkovitz & Shellis, 2017). Dengan adanya rangsangan mekanis, kimiawi, maupun bakteri, jaringan pulpa dapat mengalami kerusakan bahkan kematian sel (Ingle, 2019).

Pada karies gigi dapat dilihat adanya proses pergeseran ekologi pada biofilm gigi, dimana terjadi peningkatan kariogenitas serta asam organik yang mendukung

terjadinya demineralisasi (Conrads & About, 2018). Ketika lesi karies berprogres dari dentin mencapai pulpa, terjadi peningkatan keparahan inflamasi pada pulpa. Inflamasi pada pulpa disebut sebagai pulpitis, yang melibatkan pembuluh darah, saraf, dan reaksi pertahanan tubuh (Berkovitz & Shellis, 2017). Pada kondisi ini, komposisi bakteri yang terlibat berbeda dengan lesi pada enamel. Bakteri anaerob yang berperan dalam proses inflamasi pulpa antara lain *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, dan *Treponema denticola* yang merupakan bakteri gram negatif (Rôças *et al.*, 2016; Brodzikowska *et al.*, 2022).

Kondisi pulpa yang terpapar merupakan rute yang jelas terjadinya infeksi endodontik oleh karena bakteri gram negatif anaerob. Ketika rute bakteri mencapai saluran akar, akan terjadi infeksi intraradikular dengan terjadinya inflamasi dan kematian jaringan pulpa (Garg & Garg, 2019). Pulpa yang terinflamasi berhubungan dengan perubahan saraf pada pulpa, yang mengarah pada nyeri, serta perubahan degeneratif dan nekrosis pulpa (Ingle, 2019). Sehingga dibutuhkan perawatan endodontik yang baik untuk mengatasi infeksi dengan melakukan perawatan saluran akar (Berman & Hargreaves, 2020).

Pada sesi perawatan saluran akar, dapat terjadi *flare-up* (Ingle, 2019). *Flare-up* adalah terjadinya nyeri, bengkak, maupun keduanya pada saat dilakukan perawatan saluran akar, dimana menyebabkan kunjungan tidak terjadwal oleh pasien. Terjadinya *flare-up* dapat disebabkan oleh karena mekanis dengan instrumentasi berlebihan, kimiawi oleh karena medikamen, maupun mikroba yang dikombinasi dengan kesalahan iatrogenik (Garg & Garg, 2019). *Flare-up* yang disebabkan oleh bakteri gram negatif pada saluran akar, terutama bakteri *Porphyromonas* dan *Prevotella* memiliki kemungkinan berhubungan dengan

preparasi yang tidak memadai, aseptis yang tidak memadai selama prosedur, jaringan karies tidak bersih, atau tumpatan sementara yang non hermetis atau jika dibiarkan lebih dari dua minggu (Bassam *et al.*, 2021). Pada laporan dari sejumlah kasus *flare-up* menurut Bassam *et al.* (2021), terjadinya *flare-up* pada perawatan saluran akar berkisar antara 1,4% sampai dengan 16%. Adapun faktor yang mempengaruhi terjadinya *flare-up* antara lain usia, jenis kelamin, tipe gigi, status periapikal, jumlah kunjungan, serta perawatan berulang (Garg & Garg, 2019).

Dalam beberapa studi dikatakan bahwa terdapat perbedaan tingkatan *flare-up* yang dipengaruhi oleh diagnosis pulpa. Diagnosa pulpa terdiri dari kondisi pulpa normal, pulpitis, serta nekrosis pulpa. Diagnosis pulpa normal adalah keadaan dimana tidak terdapat gejala untuk menandakan diagnosis suatu kelainan, dengan reaksi normal terhadap dingin serta *Electric Pulp Test* (EPT) (Ingle, 2019). Diagnosa jaringan pulpa dapat ditentukan oleh kualitas jaringan pulpa. Dapat dikatakan bahwa kualitas jaringan pulpa dipengaruhi oleh jumlah sel saraf pada jaringan pulpa (Sampoerno *et al.*, 2019). Peningkatan intensitas impuls menunjukkan stimulasi oleh serabut saraf dalam jumlah yang banyak (Modaresi *et al.*, 2016). Ketika terjadi degenerasi serabut saraf mempengaruhi kepadatan persarafan pulpa. Pada kondisi peradangan pulpa, terjadi gangguan keseimbangan antara saraf sensorik simpatis dan parasimpatis. Pada pulpa gigi yang mengalami denervasi menunjukkan perkembangan pulpitis serta nekrosis pulpa yang lebih luas dibandingkan dengan pulpa gigi yang normal (Zhan *et al.*, 2021). Selain itu, terjadi penurunan potensial aksi sel saraf pada lingkungan yang terjadi peradangan dan ditemukan juga protein pada eksoplasma serabut saraf pada kondisi peradangan pulpa (Modaresi *et al.*, 2016). Pada pulpa dengan kondisi pulpitis ireversibel, terjadi

neurodegeneratif saraf bermielin dengan tingkat sedang hingga berat. Perubahan degeneratif ini termasuk degenerasi granular, degenerasi pengelupasan, serta disintegrasi selubung mielin dan vakuolisasi (Zhan *et al.*, 2021). Kondisi peradangan pada jaringan pulpa yang disebabkan oleh lipopolisakarida bakteri gram negatif secara progresif dapat terjadi kematian sel (Ingle, 2019). Dengan adanya lipopolisakarida dapat menyebabkan neuroinflamasi yang berhubungan dengan neurodegenerasi. Pada sejumlah penelitian dikatakan bahwa terjadi kematian sel saraf yang akibat inflamasi secara progresif dari lipopolisakarida. Induksi inflamasi tersebut dapat dicapai dengan berbagai cara, salah satunya dengan menargetkan pada *Toll-like receptor 4* (TLR4) dan mengaktifkan jalur MyD88 yang merupakan salah satu mekanisme jalur kematian sel (Batista *et al.*, 2019).

Penyebab inflamasi jaringan pulpa adalah bakteri pathogen gram negatif anaerob pada saluran akar (Berman & Hargreaves, 2020). Menurut penelitian Nativel *et al.* (2018), *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri anaerob yang berperan dalam sejumlah penyakit inflamasi, dimana menghasilkan senyawa lipopolisakarida (LPS) yang dapat mengaktivasi banyak tipe sel melalui produksi sitokin proinflamasi. Lipopolisakarida merupakan komponen membran luar yang dimiliki oleh bakteri gram negatif. LPS terdiri dari domain hidrofobik-endotoksin-lipid A, antigen O hidrofilik dan polisakarida (Brodzikowska *et al.*, 2022). Subunit lipid A pada LPS yang dimiliki oleh bakteri *Porphyromonas gingivalis* dapat berikatan dengan reseptor permukaan sel, seperti *Toll-like Receptor 4* (TLR-4). LPS sering digunakan dalam berbagai penelitian untuk menginduksi inflamasi sel pulpa dalam penelitian laboratoris (Huang *et al.*, 2020; Brodzikowska *et al.*, 2022).

Ketika jaringan pulpa gigi teriritasi oleh adanya bakteri patogen pulpa, maka dapat terjadi tahapan inflamasi, diawali dengan pulpitis dan terjadi kematian sel (Ingle, 2019). Kematian sel merupakan suatu proses yang memiliki fungsi fisiologis maupun patologis yang terjadi pada semua organisme hidup (Bertheloot *et al.*, 2021). Peristiwa ini berlangsung dalam keseimbangan yang dinamis sebagai mekanisme homeostasis jaringan (Zhe-Wei *et al.*, 2018). Terdapat beberapa mekanisme kematian sel, antara lain nekrosis, apoptosis, dan necroptosis (Dhuriya & Sharma, 2018). Ketiga mekanisme kematian sel tersebut memiliki perbedaan. Kematian sel secara nekrosis merupakan kematian sel tidak terprogram, sebagai akibat dari kerusakan yang sedemikian luas sehingga integritas sel terganggu, secara morfologi dapat dicirikan dengan pembengkakan sitoplasma dan ruptur membran plasma (Green & Llambi, 2015). Berbeda dengan apoptosis yang secara morfologi berbeda, dengan ciri plasma membran utuh dan tidak terjadi pembengkakan sitoplasma. Necroptosis merupakan bentuk kematian sel terprogram dari nekrosis, dimana secara morfologi sama dengan nekrosis. Secara molekuler, necroptosis merupakan *caspase-independent* dan melibatkan protein RIPK3 dan MLKL, sedangkan apoptosis memerlukan aktivasi *caspase* dan melibatkan protein Bcl-2 (Chen *et al.*, 2016).

Menurut sejumlah penelitian, terjadinya inflamasi pada jaringan pulpa yang diakibatkan oleh lipopolisakarida dari bakteri gram negatif anaerob, seperti *Porphyromonas gingivalis* dapat menyebabkan kematian sel, baik itu secara nekrosis maupun apoptosis (Brodzikowska *et al.*, 2022). Kematian pulpa secara necrosis dapat terjadi dengan *coagulation necrosis*, dimana protoplasma sel menjadi *opaque*, atau dengan *liquefaction necrosis*, yang ditandai dengan lisis

menjadi massa *liquid* (Garg & Garg, 2019). Pada penelitian apoptosis sel pulpa dengan induksi LPS yang dilakukan oleh Wang *et al.* (2021), didapatkan ekspresi Bcl-2, Bax, dan C-casp 3 yang merupakan protein yang berhubungan dengan apoptosis.

Kematian sel secara necroptosis pada sel pulpa belum diketahui. Necroptosis merupakan salah satu bentuk dari kematian sel terprogram, berbeda dengan nekrosis yang merupakan bentuk kematian sel secara insidental. Secara morfologis, necroptosis menunjukkan ciri adanya pembengkakan, kerusakan plasma membran, serta lisis sel, dimana ciri ini mirip dengan nekrosis (Zhuang dan Chen, 2020). Meskipun kedua kematian sel ini secara morfologi mirip, namun memiliki perbedaan pada morfologi, dimana pada nekrosis mengalami perubahan bentuk menjadi ireguler sedangkan necroptosis berubah menjadi bulat (Ji *et al.*, 2021). Pada necroptosis akan menyebabkan peningkatan permeabilitas plasma membran sehingga dapat melepaskan *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) ke dalam lingkungan jaringan. Hal ini menginduksi sel-sel nekroptotik untuk merekrut sel-sel inflamasi untuk meninjau tingkat kerusakan jaringan dan menghilangkan sisa-sisa sel nekroptotik sehingga terjadi penurunan sel (Chen *et al.*, 2016).

Necroptosis dimediasi oleh reseptor kematian sel, seperti *Tumor Necrosis Factor* (TNF). Inisiasi necroptosis dengan reseptor memicu aktivasi *Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 3* (RIPK3), kemudian melalui fosforilasi akan mengaktivasi *Mixed lineage kinase domain-like protein* (MLKL) (Bertheloot *et al.*, 2021). MLKL adalah protein terminal necroptosis yang terbentuk sebagai substrat dari RIPK3 (Samson *et al.*, 2020). Menurut Xu *et al.*, (2019), saat ini MLKL

diyakini merupakan substrat utama dan mungkin satu-satunya substrat RIPK3 yang mempengaruhi necroptosis.

Pada sejumlah penelitian, necroptosis sel dapat diinduksi oleh LPS. Pada penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al.* (2016), jalur kematian sel melalui necroptosis diidentifikasi menggunakan 30 sampel tikus yang diinduksi dengan LPS. Untuk mengetahui apakah pada sel tersebut mengalami necroptosis, dilakukan pemeriksaan pada protein yang terlibat dalam proses necroptosis, seperti RIPK3 dan MLKL melalui imunohistokimia. Didapatkan ekspresi RIPK3 dan MLKL meningkat setelah 24 jam pemberian LPS. Selain itu, terdapat penelitian necroptosis yang dilakukan oleh Li *et al.* (2019) dengan meneliti modulasi transkripsi *Cyclin-dependent kinase 9* (CDK9) pada periodontitis menggunakan tikus yang diberi LPS dari bakteri *P. gingivalis*. Pada penelitian tersebut terjadi peningkatan protein MLKL saat diberi 10 µl LPS bakteri *P. gingivalis*. Penelitian necroptosis yang dilakukan oleh Yang dan Wang (2022), pada tikus jantan yang diberi LPS dari bakteri *P. gingivalis*, didapatkan peningkatan ekspresi RIPK3 dan MLKL yang menjadi indikator kuat dalam necroptosis pada penelitian tersebut. Dalam penelitian tersebut dikatakan bahwa MLKL memiliki sifat spesifik dibandingkan dengan protein mediator necroptosis lainnya sehingga dapat dianggap sebagai pilihan terbaik dalam mengidentifikasi terjadinya necroptosis. Hal ini didukung oleh penemuan terakhir melalui studi *in vivo* dimana salah satunya MLKL merupakan biomarker yang spesifik dalam deteksi terjadinya necroptosis (Dai *et al.*, 2021).

Berdasarkan penjelasan dan data dari penelitian di atas, maka dianggap perlu untuk mengetahui mekanisme jalur necroptosis pada sel saraf jaringan pulpa,

dengan mengidentifikasi ekspresi MLKL sebagai protein spesifik yang terlibat dalam proses necroptosis yang diinduksi dengan pemberian LPS bakteri *P. gingivalis* yang dilihat setelah 24 jam.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terjadi peningkatan ekspresi MLKL pada necroptosis sel saraf jaringan pulpa gigi pasca pemberian LPS bakteri *Porphyromonas gingivalis* setelah 24 jam?
2. Apakah terjadi penurunan jumlah sel saraf pada necroptosis sel saraf jaringan pulpa gigi pasca pemberian LPS bakteri *Porphyromonas gingivalis* setelah 24 jam?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menjelaskan terjadinya proses necroptosis pada sel saraf pada jaringan pulpa gigi setelah pemberian LPS bakteri *Porphyromonas gingivalis*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan terjadinya peningkatan ekspresi MLKL pada necroptosis sel saraf jaringan pulpa gigi pasca pemberian LPS bakteri *Porphyromonas gingivalis* setelah 24 jam.
2. Membuktikan terjadinya penurunan jumlah sel saraf pada necroptosis sel saraf jaringan pulpa gigi pasca pemberian LPS bakteri *Porphyromonas gingivalis* setelah 24 jam.