Research Report

Perbedaan daya antibiofilm *Enterococcus faecalis* antara larutan irigasi NaOCl 5,25% dan kombinasi EDTA 17% dengan NaOCl 2,5%

(Antibiofilm activity of NaOCl irrigation solution 5,25% compared to combination of EDTA 17% with NaOCl 2,5% on *Enterococcus faecalis*)

IRycka Pithaloka Sumantri [1], Dian Agustin Wahjuningrum [2], Febriastuti Cahyani [2]
[1]Mahasiswa Strata -1 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia
2Staf Pengajar Departemen Konservasi Gigi ,Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

ABSTRACT

Background: *Root canal treatment is a procedure that performed to eliminate microorganisms in the root canal of the tooth with necrotic pulp. Microorganisms in a biofilm on the root canal led to the failur e of root canal treatment. One of microorganisms that were able to form biofilms and cause failure of root canal treatment were the Enterococcus faecalis bacteria. The use of antimicrobial agents as a root canal irrigation were needed to eliminate microorganisms in the biofilms form. NaOCl is a irrigation material that is considered the most effective and popular. NaOCl has antimicrobial properties, have the ability to dispose of smear layer, lubricating, disinfecting and low viscosity so that it can penetrate into the dentin tubules well. In addition, the solution khelator often used in root canal treatment is EDTA. EDTA as kelator solution will remove the calcium ions bind chemically, would eliminate the smear layer. The combination of EDTA with NaOCl irri gation during preparation and potential as a cleansing agent to soften dentin major clinical and to reduce the smear layer, biofilm and debris.* ***Purpose:*** *The aim of this study is to know the differentiation of antibiofilm capacity Enterococcus faecalis betw een irrigation solution NaOCl 5,25% and combination of EDTA 17% with NaOCl 2,5%.* ***Methods:*** *This research was experimental laboratories in vitro research. Samples from this study that biofilms prepared from a single species bacterium E. faecalis stock ,were cultured on trypticase soy broth media (TSB). Group will be given additional treatment irrigation solution NaOCl 5.25% single, single EDTA 17% and combination of EDTA 17% and NaOCl 2.5%. Biofilm formation was observed using the microtiter plate method, then continued by reading of Optical Density (OD) of biofilms using ELISA reader at a wavelength of 570 nm.* ***Result:*** *From the result of the study it was revealed that antibiofilm of the combined irrigation solution EDTA 17% and NaOCl 2,5% had higher capacity than NaOCl 5,25% alone.* ***Conclusion:*** *antibiofilm of the combined irrigation solution EDTA 17% and NaOCl 2,5% had higher capacity than NaOCl 5,25% alone.*

Key words*: antibiofilm capacity, Enterococcus faecalis, irrigation solution NaOCl 5,25%, combination o f EDTA 17% with NaOCl 2,5%*

Korespondensi (*correspondence*): Rycka Pithaloka Sumantri, Mahasiswa program pendidikan dokter gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Mayjend Prof. Dr. Moestopo No.47 60132 Surabaya, Indonesia. E -mail: ryckapithaloka@gmail.com.

PENDAHULUAN

Pintu gerbang bagi bakteri untuk memasuki pulpa paling sering terjadi melalui karies. Berdasarkan jalan masuk mikroorganisma ke jaringan pulpa, perawatan saluran akar dapat dibedakan atas kasus vital dan non vital (nekrosis). Pada beberapa penelitian menyatakan rongga pulpa dari gigi nekrosis selalu ditemukan banyak mikroorganisma didalamnya.[1] Saluran akar dan jaringan periapikal yang mengalami infeksi merupakan media yang mendukung bagi pertumbuhan mayoritas bakteri yang mampu berkomunikasi,melakukan signaling dan membentuk kolonisasi yang dikenal sebagai biofilm. Pembentukan biofilm merupakan salah satu mekanisme pertahanan dari kumpulan bakteri.[2] Bakteri dalam bentuk biofilm adalah

salah satu proses adaptif yang memungkinkan bakteri untuk bertahan hidup dalam lingkungan nutrisi rendah pada saluran akar.[3] Biofilm yang ditemukan dominan pada saluran akar gigi nekrosis adalah *Enterococcus faecalis.* Terlihat *E. faecalis*, dapat mengadakan kolonisasi yang baik dan dapat bertahan dalam saluran akar tanpa dukungan dari bakteri lainnya. Virulensi ini menyebabkan *E. faecalis* sulit dieliminasi dari saluran akar sehingga sering ditemukan pada perawatan saluran akar yang gagal.[2]

Bakteri dalam biofilm memiliki karakteristik yang berbeda dari bentuk planktonik, termasuk ketahanan terhadap sel-sel fagositik dan obat-obatan, sehingga dapat mengakibatkan infeksi persisten.[4] Saluran akar dan jaringan periapikal yang mengalami infeksi merupakan media yang mendukung bagi bakteri untuk berkoloni menjadi struktur biofilm. Perawatan saluran akar merupakan prosedur yang dilakukan untuk mengeliminasi mikroorganisma di dalam saluran akar dan jaringan periapikal.[5] Ada tiga prinsip dasar dalam perawatan saluran akar yang dikenal sebagai "triad endodontik", terdiri dari preparasi biomekanik, irigasi dan disinfeksi, serta obturasi. Preparasi mekanis harus selalu diikuti dengan irigasi saluran akar untuk membersihkan sisa potongan jaringan pulpa, serpihan dentin,bakteri, debris dan jaringan nekrotik.[6]

NaOCl merupakan bahan irigasi yang dianggap paling efektif dan popular. NaOCl memiliki sifat antimikroba, memiliki kemampuan membuang *smear layer*, pelumas, desinfeksi, mampu melarutkan jaringan, dapat diterima jaringan, mempunyai tegangan permukan dan viskositas yang rendah sehingga dapat penetrasi ke dalam tubulus dentin dengan baik.[7] Selain itu,larutan kelator yang sering digunakan dalam perawatan saluran akar adalah EDTA. EDTA sebagai larutan kelator akan membuang ion kalsium dengan jalan mengikatnya secara kimia, akan menghilangkan smear layer[8], sehingga dianjurkan sebagai pelengkap dalam irigasi saluran akar setelah sodium hipoklorit.

Kombinasi pengkhelasi (kelator) EDTA bergantian dengan NaOCl selama proses preparasi dan irigasi berpotensi sebagai agen pembersih klinis utama untuk melunakkan dentin dan untuk mengurangi smear layer,biofilm maupun debris.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratoris *in-vitro* dengan rancangan penelitian *post test control group only design*. Sampel dari penelitian ini yaitu biofilm spesies tunggal dipersiapkan dari stok bakteri *E. faecalis* yang dikultur pada media *trypticase soy broth* (TSB).

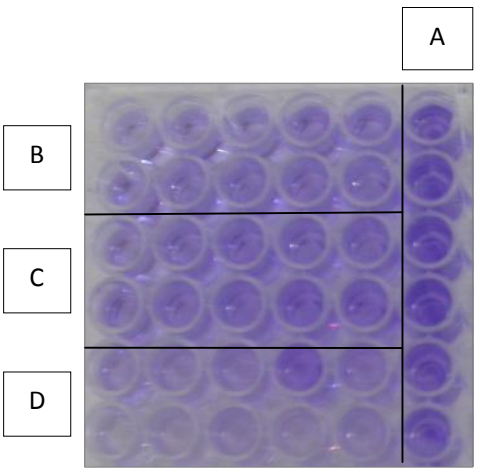
Alat yang digunakan; oese, brander soiritus, *anaerobic jar*, tabung reaksi, cawan petri, pipet, mikroskop, *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*, dan ELISA *reader*. Bahan yang digunakan; media *Tryptone Soya Broth* (TSB), bakteri *E.faecalis*, larutan irigasi NaOCl 5,25% dan larutan irigasi EDTA 17%, larutan *phosphate-buffered saline* (pH 7,3), *aquadest* steril, *crystal violet* 2%, HCl Isopropanol 200µl.

Pembentukan biofilm dan penentuan daya antibofilm : bakteri *E. faecalis* dikultur pada media *trypticase soy broth* (TSB) selama 1 x 24 jam kemudian didilusi sampai 1:100 pada TSBglu. Kemudian 0,1 ml bakteri *E. faecalis* yang telah dikultur pada media TSB dengan konsentrasi 10^6 bakteri/ml diisikan ke dalam 96-*well flat bottomed plastic tissue culture plate / microtiter plate*. Mikrotiter diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37^o C. Larutan irigasi NaOCL 5,25%, larutan irigasi EDTA 17% dan kombinasi larutan irigasi EDTA 17 % dan NaOCl 2,5% ditambahkan masing-masing 1 ml pada setiap kolom. Mikrotiter diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37^o C. Isi dari tiap mikrotiter diaspirasi dan dicuci 3 kali dengan 0,2 ml *Phosphate-buffered saline* (pH 7,3) dengan menggunakan pipet. Mikroorganisma biofilm yang menempel pada *well* diberi pewarnaan dengan *crystal violet* 0,2 ml 2%. Dilakukan pembilasan dengan menggunakan *aquadest* dan dikeringkan. Untuk menganalisis secara kuantitatif pembentukan biofilm, ditambahkan 0,2 ml dari HCl isopropanol pada setiap *well*. Kemudian dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) pada 570 nm menggunakan spektrofotometer / ELISA *reader*, prosedur ini diulang sebanyak 8 kali.

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari pembacaan spektrofotometer dengan satuan *Optical Density* setiap mikrotiter yang diberi perlakuan berbeda, yaitu pemberian larutan irigasi NaOCL 5,25%, EDTA 17% dan kombinasi larutan irigasi EDTA 17 % dan NaOCl 2,5%. Data dari setiap penelitian ini dikumpulkan dan distribusi data diperiksa dengan menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov Test* untuk melihat apakah distribusi data yang didapat normal. Analisis homogenitas yang digunakan adalah uji *one-way* ANOVA . Semua perangkat analisis menggunakan program SPSS 19.0 dari *Windows.*

HASIL

Hasil penelitian menunjukkan OD biofilm pada kelompok yang diberi perlakuan penambahan larutan kombinasi EDTA 17% dan NaOCl 2,5% mempunyai OD yang rendah daripada penambahan larutan NaOCl 5,25% tunggal maupun EDTA 17% tunggal. Dari hasil tersebut diketahui bahwa daya antibiofilm *E. faecalis* kombinasi EDTA 17% dan NaOCl 2,5% lebih besar daripada kelompok yang lain.



Gambar 1. Hasil Pewarnaan dengan Kristal Violet pada Biofilm Bakteri *E.faecalis*

Keterangan :
A.Kontrol dilakukan sebanyak 6 kali tanpa diberikan tambahan larutan apapun; B. Perlakuan dengan penambahan larutan NaOCl 5,25%; C. Perlakuan dengan penambahan larutan EDTA 17%; D. Perlakuan dengan penambahan kombinasi EDTA 17% dan NaOCl 2,5%

Tabel 1. Nilai rerata *Optical Density* biofilm, standar deviasi, dan jumlah sampel.

No	Kelompok	Mean	SD	N
1	Kontrol	0.95	0.16	6
2	EDTA 17%	0.35	0.03	6
3	NaOCl 5,25%	0.35	0.01	6
4	Kombinasi	0.13	0.01	6

Keterangan :
1 : Kelompok kontrol
2 : Kelompok penambahan larutan larutan EDTA 17%
3 : Kelompok dengan penambahan larutan NaOCl 5,25%
4 : Kelompok dengan penambahan kombinasi EDTA 17% dan NaOCl 2,5%

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi larutan EDTA 17% dan NaOCl 2,5% mempunyai daya antibiofilm daripada kelompok yang lain dengan rerata OD paling rendah yaitu 0.13 (Tabel 1)

Dari hasil uji statistik *Kolmogorov-Smirnov Test* masing-masing kelompok menunjukkan nilai p > 0,05 artinya data berdistribusi normal. Kemudian dilakukan uji homogenitas varians dengan *Levene's Test* didapatkan p = 0.140, ini menunjukkan semua kelompok homogen. Setelah diketahui semua kelompok mempunyai distribusi normal dan homogen,maka untuk mengetahui adanya perbedaan nilai densitas dilakukan uji *Oneway ANOVA* dan didapatkan hasil terdapat perbedaan bermakna pada nilai OD pada perlakukan dengan nilai p = 0.000.

Tabel 2. Hasil *Post-hoc Multiple Comparison Test*

	EDTA 17%	NaOCl 5,25%	Kombinasi
Kontrol	0.00	0.00	0.00
EDTA 17%	-	1.00	0.00
NaOCl 5,25%	1.00	-	0.00
Kombinasi	0.00	0.00	-

Untuk mengetahui kelompok data mana yang memiliki perbedaan OD biofilm yang bermakna, maka dilakukan *Post-hoc Multiple Comparison Test*. Dari hasil *Post-hoc* (Tabel 2) terlihat bahwa kelompok konsentrasi kombinasi larutan EDTA 17 % dan NaOCl 2,5% mempunyai perbedaan yang bermakna dengan larutan NaOCl 5,25% tunggal dan EDTA 17% tunggal. Sedangkan antar kelompok larutan NaOCl 5,25% tunggal dan EDTA 17% tunggal tidak memiliki perbedaan OD biofilm yang bermakna.

PEMBAHASAN

Mikroorganisma dalam bentuk biofilm pada perawatan saluran akar dapat menyebabkan kegagalan perawatan saluran akar. Salah satu bakteri yang mampu membentuk biofilm sebagai wujud pertahanan dan sering menyebabkan kegagalan perawatan saluran akar adalah bakteri *Enterococcus faecalis*. Eliminasi mikroorganisma yang membentuk biofilm pada saluran akar sulit dilakukan, oleh karena itu penggunaan agen antimikroba sebagai bahan irigasi saluran akar diperlukan untuk menghilangkan bakteri dalam bentuk biofilm.

Ada tiga prinsip dasar dalam perawatan saluran akar yang dikenal sebagai "triad endodontik", terdiri dari preparasi biomekanik, irigasi dan disinfeksi, serta obturasi. Preparasi mekanis harus selalu diikuti dengan irigasi saluran akar untuk membersihkan sisa potongan jaringan pulpa, serpihan dentin,bakteri, debris dan jaringan nekrotik.[6]

E. faecalis merupakan biofilm yang ditemukan dominan pada saluran akar gigi nekrosis. *Biofilm E. faecalis,* dapat mengadakan kolonisasi yang baik dan dapat bertahan dalam saluran akar tanpa dukungan dari bakteri lainnya. Biofilm terdiri dari outer membran dan matriks biofilm.[2]

Pada tahap pertama pemberian larutan irigasi EDTA 17% pada biofilm akan berpengaruh pada matriks dan outer membran. Untuk mempertahankan matriks biofilm tersebut, biofilm *E.faecalis* membutuhkan kalsium, besi dan magnesium. Kalsium jika diberi EDTA 17%, maka EDTA 17% akan mengikat ion kalsium tersebut,sehingga stabilisasi matriks biofilm terganggu dan menyebabkan ikatan matriks biofilm menjadi kecil. Besi pada matriks biofilm dapat membuat viskositas bakteri menjadi lebih besar. Namun jika besi diberi EDTA 17% maka EDTA 17% akan mengikat ion besi, sehingga viskositas bakteri mengecil dan menyebabkan ikatan matriks biofilm tersebut menjadi lebih kecil. Magnesium jika diberi EDTA 17% ,maka akan terjadi pelepasan LPS dari outer membran sehingga sel terlepas dan menjadi lisis.[8]

EDTA 17% dapat mengeluarkan smear layer dari saluran akar. Smear layer mengandung debris dentin, material organik, material anorganik dan mikroorganisme. Larutan EDTA 17% juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri karena adanya *ion metallic* / logam yang bersifat chelate tidak dapat dilalui oleh mikroorganisme. Mekanisme EDTA 17% dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme disebabkan adanya ion-ion logam yang bersifat *chelate* yang tidak dapat dicapai oleh mikroorganisme tersebut.[9]

Outer membran terdiri dari LPS, LPS ini jika diberi EDTA 17%, maka akan terjadi diversifikasi kation divalen pada EDTA 17% sehingga permeabilitas membran menjadi meningkat, dan biofilm *E.faecalis* menjadi hidrofobik. Jika demikian, pemberian NaOCl 2,5% pada tahap kedua, akan lebih memudahkan untuk membunuh biofilm tersebut,karena ikatan matriks biofilm *E. faecalis* sudah merenggang dan biofilm *E. faecalis* sudah menjadi hidrofobik, sehingga daya bunuh terhadap biofilm *E.faecalis* meningkat.[8,10]

Sifat antibiofilm NaOCl 2,5% didapatkan dari reaksi kloraminasi antara klorin dan asam amino (NH) yang dapat mengganggu metabolisme sel karena klorin merupakan oksidator kuat yang menyebabkan terjadinya oksidasi protein dan enzim sel. Reaksi oksidasi oleh klorin yang dilepaskan menyebabkan terjadinya hidrolisis sehingga membran sel mengalami kerusakan dan akhirnya sel biofilm menjadi lisis.[10]

Cara kerja NaOCl 2,5% dalam membunuh biofilm melalui beberapa cara antara lain dengan melepaskan oksigen bebas yang bergabung dengan sel protoplasma akan merusak sel, perubahan membran sel yang menyebabkan difusi isi sel biofilm keluar,kemudian secara mekanis CL_2 dapat menyebabkan sel rusak dan oksidasi CL_2 pada enzim dapat menyebabkan hambatan kerja enzim dan kematian sel biofilm.[11]

Larutan irigasi NaOCl 2,5% sangat efektif untuk mengeluarkan komponen organik dari saluran akar, sedangkan larutan EDTA 17% sangat efektif untuk mengeluarkan komponen anorganik dari saluran akar.[11] Apabila EDTA 17% diberikan sebelum NaOCl 2,5%, maka akan didapatkan efek ganda dalam mengeluarkan komponen organik dan anorganik dari dalam saluran akar.

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa daya antibiofilm E.*faecalis* kombinasi larutan irigasi EDTA 17 % dan NaOCl 2,5% lebih baik daripada penggunaan larutan irigasi NaOCl 5,25% tunggal karena larutan irigasi kombinasi EDTA 17% dan NaOCl 2,5% bekerja secara multifungsional ,daya kerjanya saling menguatkan untuk menghambat pertumbuhan biofilm, memecah ikatan biofilm, menyebabkan lisis pada sel biofilm, mengganggu metabolisme serta menghambat kerja enzim biofilm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gomes M. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. Odontology.2005;94:1–9
2. Hojo, K., et al. Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. J Dent Res. 2009;88(11):982-90
3. Shrestha, A., et al. Nanoparticulates for Antibiofilm Treatment and Effect of Aging on Its Antibacterial Activity. J Endod.2010;36: 1030–5

4. Fujii, R., et al. Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions . Oral Microbiology Immunology.2009; 24: 502–5
5. Narayanan, L. L., Vaishnavi, C. Endodontic Microbiology. Journal of Conservative Dentistry.2010; Vol 13: 233.
6. Shahani, M. N., Subba Reddy, V. Comparison of Antimicrobial Substantivity of Root Canal Irrigants in Instrumented Root Canals up to 72 h: An in vitro study. Journal of the Indian Society of Pedodontics & Preventive Dentistry2011.; 29(1) : 29.
7. Hülsmann, M., Rödic, T., Normeyer, S. Complications during Root Canal Irrigation. Endodontic Topics. 2009;27–63 : 27-8.
8. Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S and Sekine I. Clinical Evaluation od the efficacy of EDTA Solution as an Endodontic Irrigant. J Endod.2005; 5 :20-5.
9. Garcia DA. Use of EDTA in Endodotic Therapy. Carlos Vaultz. 2001. p: 104-5
10. Estrela, C., et al. A Model System To Study Antimicrobial Strategies in Endodontic Biofilms. J Appl Oral Sci. 2009;17(2):87-91
11. Karale, R., Thakore, A., Shetty, V. K. An evaluation of antibacterial efficacy of 3% sodium hypochlorite, high-frequency alternating current and 2% chlorhexidine on Enterococcus faecalis: An in vitro study. Journal of Conservative Dentistry.2011; 14 (1) : 2.
12. Beltz RE, Torabinejad M and Pouresmail M. In vitro Antimicrobial Activity of the Solubilizing Action of MTAD, Sodium Hypochlorite, and EDTA on Dental Pulp. J Endodon.2003;29(5): 334-7