

TESIS

**DETEKSI eDNA DAN EKSPRESI TNF- PASCA
PEMBENTUKAN BIOFILM *Enterococcus faecalis*
PADA GIGI MOLAR *Rattus norvegicus* Sprague dawley**



Oleh :

Nur Ariska Nugrahani
NIM 091724353009

**PROGRAM STUDI MAGISTER
IMUNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

TESIS

**DETEKSI eDNA DAN EKSPRESI TNF- PASCA
PEMBENTUKAN BIOFILM *Enterococcus faecalis*
PADA GIGI MOLAR *Rattus norvegicus* Sprague dawley**

Oleh :

**Nur Ariska Nugrahani
NIM 091724353009**

**PROGRAM STUDI MAGISTER
IMUNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

TESIS

**DETEKSI eDNA DAN EKSPRESI TNF- PASCA
PEMBENTUKAN BIOFILM *Enterococcus faecalis*
PADA GIGI MOLAR *Rattus norvegicus* Sprague dawley**

**Untuk Memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Immunologi
Pada Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**Nur Ariska Nugrahani
NIM 091724353009**

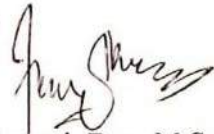
**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 21 JANUARI 2020

Oleh :

Pembimbing Ketua



Heny Arwati, Dra., M.Sc, Ph.D
NIP. 196402291991022001

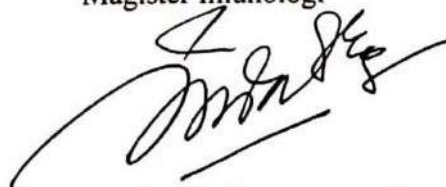
Pembimbing Kedua



Prof. Dr. A. Retno Pudji Rahayu, drg., M.Kes
NIP. 195911141986032002

Mengetahui,

Koordinator Program Studi
Magister Imunologi



Dr. Theresia Indah Budhy, drg., M.Kes.
NIP.196106071987032005

Tesis ini telah diuji dan dinilai
oleh Panitia Penguji Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga
pada Tanggal 14 Januari 2020

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Hartono Kahar, dr, MQIH.

Anggota : 1. Heny Arwati, Dra., M.Sc, Ph.D
2. Prof. Dr. A. Retno Pudji Rahayu. drg., M.Kes
3. Dr. Willy Sandika., dr., M.S, Sp.PA (K)
4. Dr.Budi Utomo., dr., M.Kes

PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Nur Ariska Nugrahani
NIM : 091724353009
Program Studi : Magister Immunologi
Judul Tesis : Deteksi eDNA dan Ekspresi TNF- α Pasca Pembentukan
Biofilm *Enterococcus faecalis* pada Gigi Molar *Rattus norvegicus* Sprague dawley

Menyatakan dengan sebenarnya pada Tesis saya ini adalah asli (hasil karya sendiri) bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (Plagiarism) dari karya orang lain. Tesis ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik.

Dalam tesis ini tidak terdapat pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan didalam daftar pustaka. Demikian, pernyataan ini dibuat tanpa adanya paksaan dari pihak manapun, apabila pernyataan ini tidak benar, maka saya bersedia sanksi sesuai dengan norma dan peraturan yang berlaku di Universitas Airlangga.

Surabaya, 8 Januari 2020



Nur Ariska Nugrahani

091724353009

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Kehadirat Allah SWT, Tuhan Yang Maha Esa, dengan rahmat kasih sayang-Nya dan atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan tesis dengan judul **“Deteksi eDNA dan Ekspresi TNF- Pasca Pembentukan Biofilm *Enterococcus faecalis* pada Gigi Molar *Rattus norvegicus* Sprague dawley”**.

Pada kesempatan ini saya ingin menyampaikan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Mohammad Nasih, S.E., M.T., Ak., CMA., atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menjalani pendidikan Universitas Airlangga.
2. Direktur Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga Prof.Dr.Hj. Sri Iswati, SE., M.Si., Ak dan Koordinator Program Studi Magister Immunologi yaitu Dr. Theresia Indah Budhy, drg., M.Kes atas kesempatan mengikuti pendidikan di Program Studi Magister Immunologi Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si., Med, SpA(K) atas kesempatan yang diberikan untuk penelitian di laboratorium biokimia dan laboratorium sentral ilmu hayati.
4. Heny Arwati, Dra., M.Sc, Ph.D selaku dosen Pembimbing I atas peran dan jasanya dalam memberikan ilmu, meluangkan waktunya dan arahan selama penelitian dan penyusunan tesis.
5. Prof. Dr. A. Retno Pudji Rahayu, drg., M.Kes selaku dosen Pembimbing II atas peran dan jasanya dalam memotivasi, memberikan bimbingan, arahan selama penelitian dan penyusunan tesis.

6. Dr. Hartono Kahar, dr, MQIH selaku Penguji, atas masukan dan saran yang baik sekali dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.
7. Dr. Willy Sandika., dr., M.S, Sp.PA (K) selaku Penguji, atas masukan dan saran yang baik sekali dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.
8. Dr.Budi Utomo., dr., M.Kes selaku Penguji, atas masukan dan saran yang baik sekali dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.
9. Dr. Agung Dwi Wahyu Widodo, dr., M.Si, M. Ked. Klin., Sp. MK selaku dosen mikrobiologi dari program studi imunologi yang senantiasa berbagi ilmu dalam penelitian dan penyusunan tesis.
10. Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc selaku dosen Imunologi dari program studi imunologi yang senantiasa membantu memecahkan permasalahan dan memberikan pencerahan dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.
11. Eyang tercinta, Ir. Sudiyono Kromodihardjo, M.Sc., Ph.D yang selalu memberi motivasi, doa, bantuan moril dan materiil sehingga penelitian ini bisa berjalan sesuai yang diharapkan dan selesai tepat waktu.
12. Sahabat karib dari orang tua, Prof. Dr. agr. Mohamad Amin, S.Pd, M.Si yang selalu memberikan bantuan dan support dalam hal apapun jika saya menemui kesulitan dalam menyelesaikan penyusunan tesis ini.
13. Orang tua tercinta, Bapak Supardi dan Ibu Pujiastuti yang selalu memberi motivasi, doa, bantuan moril dan materiil sehingga penelitian ini bisa berjalan sesuai yang diharapkan dan selesai tepat waktu.

14. Keluarga besar Nganjuk, Kediri, Surabaya dan Malang, yang selalu memberi memberi motivasi, doa, bantuan moril dan materiil sehingga penelitian ini bisa berjalan sesuai yang diharapkan dan selesai tepat waktu.
15. Sahabat yang selalu menemani dan membantu dalam pengerjaan tesis ini serta teman dari magister imunologi angkatan 2017 Semester Genap, sehingga dapat menyelesaikan tesis ini tepat waktu.
16. Pihak-pihak yang dibelakang layar yang selalu yang mendukung yang tidak bisa disebutkan satu persatu dan supportnya tiada akhir dalam menyelesaikan tesis ini.

Saya menyadari masih banyak kekurangan yang ada dalam tesis ini. Oleh karena itu, saya mengharapkan kritik dan masukan dari semua pihak demi penyempurnaan di masa mendatang. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat dan kebaikan bagi kita semua

Surabaya, 8 Januari 2020

Penulis

RINGKASAN

DETEKSI eDNA DAN EKSPRESI TNF- PASCA PEMBENTUKAN BIOFILM *Enterococcus faecalis* PADA GIGI MOLAR *Rattus norvegicus* Sprague dawley**Nur Ariska Nugrahani**

Bakteri *E. faecalis* merupakan bakteri gram positif fakultatif anaerob dengan prevalensi sekitar 24% hingga 77% namun pada studi molekuler bakteri ini ada sejak terjadi nekrosis pulpa. Bakteri *E. faecalis* mempunyai kemampuan bertahan hidup tinggi dan tumbuh di mikro-lingkungan dengan berkolonisasi membentuk biofilm. Biofilm *E. faecalis* yang mengalami maturasi akan membentuk *quorum sensing*. Komponen biofilm yang matang mengandung polisakarida, gelatinase (gelE), serine protease (sprE) dan ekstraseluler DNA (eDNA) dan Autolysin (Atla). Ekstraseluler DNA (eDNA) merupakan tanda awal pembentukan biofilm. eDNA yang terbentuk akan memicu respon imun innate yang akan dikenali oleh *Pattern Recognition Receptor* (PRR) sebagai PAMPs sehingga akan ditangkap oleh *Toll-like Receptor-9* (TLR-9) dan jalur komplemen. Infeksi yang terjadi yang disebabkan oleh biofilm *E. faecalis* dapat merangsang sitokin pro-inflamasi berupa TNF- .

Penelitian ini menggunakan sampel berupa *Rattus norvegicus* galur Sprague dawley sebanyak 36 tikus yang dibagi menjadi 6 kelompok. Gigi molar pertama atas sinistra dibur hingga mencapai ruang pulpa dan dipajan dengan bakteri *E. faecalis* 0,5 Mc Farland atau 1×10^8 bakteri/mL dan diamati pada 24 jam, 72 jam dan 120 jam setelah infeksi. Pada 24, 72 jam, 120 jam setelah infeksi, tikus didekaputasi, diambil jaringan gigi molar pertama, fiksasi dengan menggunakan formalin 10% dan didekalsifikasi selama 2 bulan dengan menggunakan EDTA 6%. Pembuatan blok paraffin dan dipotong dengan *rotary microtome* dengan ketebalan 4 μ m dan dibuat preparat untuk melihat ekspresi TNF- (Santa Cruz Biotechnology, Europe) dengan mikroskop binokuler (cahaya) dan eDNA dengan pengecatan TOTO-1 dan SYTO-60 (Molecular Probes, Thermofisher) menggunakan mikroskop confocal (CLSM). Analisis data menggunakan *shapiro wilk* untuk uji normalitas data, uji levenne untuk uji homogenitas dan uji *independent t-test* untuk uji perbedaan antar kelompok perlakuan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa eDNA pada 24 jam setelah infeksi menunjukkan jumlah rerata eDNA lebih tinggi ($18,16 \pm 5,3$) daripada pada 72 jam ($17,66 \pm 4,27$) dan 120 jam ($11,16 \pm 4,62$) setelah infeksi. Jumlah rerata TNF- pada 24 jam setelah infeksi lebih tinggi ($14,83 \pm 1,83$) dibandingkan dengan 72 jam ($11,83 \pm 2,63$) dan 120 jam ($12,33 \pm 2,1$) setelah infeksi bakteri *E. faecalis*.

eDNA diamati dengan *Confocal Laser Microscopy* (CLSM) yang berwarna hijau terang disekitar membran bakteri. Jumlah eDNA yang tinggi terjadi pada tempat infeksi yang akan merangsang pembentukan *neutrofil extracellular traps* (NETs) dengan neutrofil dan sel imun lain melalui pelepasan inti nukleus neutrofil yang akan menghancurkan dirinya sendiri dengan

mengeluarkan mitokondria yang bersifat baktericidal, peptida-peptida dan anti-bakteri sehingga akan memicu NETosis yang akan mengakibatkan membran seluler dari jaringan pulpa yang terinfeksi bakteri rusak yang dapat mengakibatkan sel lisis. Ekspresi TNF- diamati dengan menggunakan metode imunohistokimia yang diekspresikan oleh makrofag. Ekspresi TNF- dipengaruhi oleh perannya dalam menyampaikan informasi dari sistem innate ke sistem imunitas adaptif, *Compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS)* dan *Systemic inflammatory response syndrome (SIRS)*, *Matriks-metallopeptidases (MMP-1)* dan *(MMP-13)*.

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan berupa terdapat penurunan jumlah rerata eDNA pasca pembentukan *biofilm* pada 24 jam hingga 120 jam yang menandakan bahwa indikasi terjadinya penurunan infeksi primer *E.faecalis* ada 120 jam dan terdapat peningkatan ekspresi TNF- pasca pembentukan *biofilm* yang diekspresikan oleh makrofag pada 24 jam hingga 120 jam yang menandakan bahwa indikasi infeksi sekunder dan persistensi bakteri *E.faecalis*.

SUMMARY

**Detection eDNA and Expression of TNF- Pasca Formation of Biofilm
Enterococcus faecalis in Molar Dental Rattus norvegicus strain Sprague
dawley**

Nur Ariska Nugrahani

E. faecalis bacteria is a facultative anaerobic gram-positive bacterium with a prevalence of around 24% to 77% but in molecular studies, this bacterium has existed since pulp necrosis occurred. *E. faecalis* bacteria have high survival ability and grow in micro-environment by colonizing to form biofilms. Matured *E. faecalis* biofilms will form quorum sensing. The mature biofilm component contains polysaccharides, gelatinase (gelE), serine protease (sprE) and extracellular DNA (eDNA) and autolysin (Atla). Extracellular DNA (eDNA) is an early sign of biofilm formation. The formed eDNA will trigger an innate immune response that will be recognized by Pattern Recognition Receptor (PRR) as PAMPs so that it will be captured by Toll-like Receptor-9 (TLR-9) and the complement pathway. Infection that occurs due to *E. faecalis* biofilms can stimulate pro-inflammatory cytokines in the form of TNF- .

This study uses 36 Rattus norvegicus Sprague dawley strains as many as 36 rats divided into 6 groups. The first molar teeth over the sinistra were drained until they reached the pulp chamber and were exposed with 0.5 Mc Farland *E. faecalis* bacteria or 1×10^8 bacteria / mL and observed at 24 hours, 72 hours and 120 hours after infection. At 24, 72 hours, 120 hours after infection, the rat was decapitated, first molar tissue was taken, fixed using 10% formalin and decalcified for 2 months using 6% EDTA. Making paraffin blocks and cut with rotary microtome with a thickness of 4 μ m and made preparations to see the expression of TNF- (Santa Cruz Biotechnology, Europe) with a binocular (light) microscope and eDNA by painting TOTO-1 and SYTO-60 (Molecular Probes, Thermofisher) using a confocal microscope (CLSM). Data analysis used Shapiro Wilk for normality data test, Levene test for homogeneity test and Independent t-test for difference test between treatment groups.

The results showed that eDNA at 24 hours after infection showed a higher mean number of eDNA (18.16 ± 5.3) than at 72 hours (17.66 ± 4.27) and 120 hours (11.16 ± 4.62) after infection. The mean number of TNF- at 24 hours after the infection was higher (14.83 ± 1.83) compared to 72 hours (11.83 ± 2.63) and 120 hours (12.33 ± 2.1) after bacterial infection *E. faecalis*.

eDNA was observed with a bright green Confocal Laser Microscopy (CLSM) around the bacterial membrane. A high amount of eDNA occurs at the site of infection which will stimulate the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) with neutrophils and other immune cells through the release of neutrophil nuclei that will self-destruct by removing mitochondria that are bactericidal, peptides and anti-bacteria so that they will self-destruct by releasing nuclei of neutrophils that will self-destruct triggering NETosis which will cause cellular membrane of pulp tissue infected with bacterial damage that can cause lysis cells and eDNA which were originally in the pulp chamber will come out

and spread to the periapical area. TNF- expression was observed using immunohistochemical methods expressed by macrophages. TNF- expression is influenced by its role in conveying information from the innate system to the adaptive immune system, Compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) and Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), Matrix-metallopeptidases (MMP-1) and (MMP-13).

Based on the results of the study it can be concluded in the form of a decrease in the average number of eDNA after the formation of biofilms at 24 hours to 120 hours, indicating that there is an indication of a decrease in primary *E. faecalis* infection by 120 hours and an increase in TNF- expression after the formation of biofilms expressed by macrophages on macrophages 24 hours to 120 hours which indicates that indications of secondary infection and persistence of *E. faecalis* bacteria.