

PENGARUH PEMAPARAN *Entamoeba gingivalis* TERHADAP JUMLAH POLIMORFONUKLEAR NEUTROFIL (PMN) PADA TIKUS WISTAR JANTAN DENGAN RADANG GINGIVA

Dewi Maya Dyaningsih, Depi Praharani
Bagian Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

ABSTRACT

Entamoeba gingivalis is one type of parasite that found in the gingival inflammation. Polymorphonuclear neutrophil (PMN) play a role at the beginning of inflammation. This study aims to determine the effect of exposure *E. gingivalis* to the number of PMN in Wistar male rats with gingival inflammation. The cervical of mandibular incisor of all experimental animals was ligated with a wire to get the state of gingival inflammation and then they divided into two groups, namely control and treatment group. The control group was exposed to the physiological solution, whereas the treatment group were exposed to *E. gingivalis* for six days. Exposure performed one day after ligated. Data obtained by counting the number of PMN each group on days 4 and 7. The results show that the number of PMN on the day of the 4th and 7th there was no significant difference between control and treatment group. The conclusion of this study is the exposure of *E. gingivalis* did not affect the number of PMN in Wistar male rats with gingival inflammation.

Keywords: *Entamoeba gingivalis*, gingival inflammation

Korespondensi (correspondence): Depi Praharani, Bagian Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Jl. Kalimantan 37 Jember 68121, Indonesia.

Parasit adalah suatu organisme yang bertempat tinggal pada atau di dalam organisme hidup yang lain supaya memperoleh lingkungan dan zat makanan yang diperlukan bagi pertumbuhan dan reproduksinya. Parasit tersebut dapat menimbulkan penyakit jika ia merusak hospes atau inangnya sampai suatu taraf tertentu. Pada manusia parasit dapat menimbulkan gangguan pada bagian yang diserang¹, tetapi ada juga beberapa parasit yang menginfeksi tanpa menunjukkan gejala klinis yang pasti. Salah satu diantaranya dan bahkan dianggap sebagai parasit yang komensal adalah *Entamoeba gingivalis*. Parasit ini habitatnya di dalam rongga mulut² terutama pada gigi berlubang dan sulkus gingiva serta di jaringan gingiva sekitar gigi khususnya pada keadaan radang atau bernanah.³

Radang merupakan reaksi jaringan hidup terhadap semua bentuk jejas dimana dalam reaksi ini ikut berperan pembuluh darah, saraf, cairan dan sel-sel tubuh di tempat jejas.⁴ Salah satu sel pertahanan tubuh yang berperan dalam proses peradangan adalah sel darah putih atau leukosit.⁵

Sel darah putih yang muncul pertama kali dalam jumlah besar pada awal peradangan (akut) adalah neutrofil⁵ yang biasanya disebut juga sebagai polimorfonuklear neutrofil (PMN) karena adanya bentuk nukleus yang bervariasi.⁶ PMN mampu bergerak aktif seperti amuba dan mampu menelan berbagai zat asing dengan proses yang disebut fagositosis. Sel ini akan mendekati zat yang akan difagosit, mengalirkan sitoplasmanya mengelilingi zat tersebut dan akhirnya mengambilnya ke

dalam bungkus sitoplasma pada vesikel terikat membran yang menonjol keluar dari PMN.⁴ Sitoplasma dari PMN mengandung dua jenis granula yang berperan penting untuk menghancurkan zat asing.⁷

Hasil penelitian yang dilakukan Lyons menunjukkan bahwa *E. gingivalis* ternyata memfagosit sitoplasma dan nukleus dari sel darah putih. Selain itu *E. gingivalis* juga menyerang sel darah merah dan menghisap hemoglobin pada jaringan yang terinfeksi.⁸ Hasil tersebut diperkuat oleh Bonner yang menyatakan bahwa secara mikroskopis terlihat *E. gingivalis* memfagosit nukleus sel darah putih dan sel darah merah. Proses invasinya ke jaringan melalui epitel sulkus gingiva, kemudian melekat dan membuat kontak yang erat antara parasit dan sel target untuk melakukan sitolisis.⁹ Padahal seperti diketahui sel darah putih merupakan sel yang berperan pada pertahanan tubuh.

Habitat *E. gingivalis* pada gingiva yang mengalami peradangan dan kemampuannya untuk memfagosit sel darah putih inilah yang mendasari penulis untuk melakukan penelitian tentang pengaruh *E. gingivalis* terhadap PMN sebagai salah satu jenis sel darah putih yang berperan penting pada awal peradangan.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan *post test only control group design*. Sampel yang digunakan adalah tikus *Wistar* berjenis kelamin jantan yang sehat, usia 2-3 bulan dengan berat 140-240 gram. Sebelum penelitian tikus diadaptasikan terhadap lingkungan kandang di Laboratorium Fisiologi FKG Universitas Jember selama 1 minggu serta

diberi makan dan minum setiap hari secara *ad libitum*. Berat badan tikus ditimbang baik sebelum maupun sesudah proses adaptasi.

Sampel dikelompokkan secara acak menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan perlakuan masing-masing berjumlah 8 ekor. Semua sampel diligasi pada leher gigi insisivus rahang bawahnya menggunakan kawat dengan diameter 0,15 mm. Pada kelompok kontrol satu hari setelah ligasi disemprot dengan larutan fisiologis sebanyak 0,2 ml ke dalam sulkus gingiva, sedangkan untuk kelompok perlakuan satu hari setelah ligasi disemprot dengan *E. gingivalis* sebanyak 0,2 ml. Perlakuan ini masing-masing dilakukan selama 6 hari. Pada hari ke-4 dan ke-7 dibuat hapusan darah, pengecatan dan pemeriksaan hapusan darah.

Prosedur pembuatan hapusan darah.

Setetes darah diambil dari ekor tikus dengan cara membuat sayatan pada ekornya, kemudian diletakkan 1 cm dari satu ujung *object glass*. *Deck glass* dipegang sedemikian rupa sehingga membuat sudut ± 30° dengan *object glass* dan tetesan darah terletak dalam sudut tersebut. *Deck glass* digeser ke arah tetesan darah, sehingga menyentuhnya dan darah tadi akan dibiarkan merata antara ujung *deck glass* dan *object glass*. Secara cepat *deck glass* digeser ke arah berlawanan dengan arah pertama sehingga darah akan merata di atas *object glass* sebagai lapisan yang tipis. Hapusan segera dikeringkan dengan menggerak-gerakkan di udara atau dapat dipakai kipas angin. Jangan ditiup dengan hembusan nafas. Tebalnya lapisan darah tergantung dari: besarnya tetesan darah, cepatnya menggeserkan *deck glass*, dan sudut antara *deck glass* dan *object glass*. Gerakan yang pelan atau sudut yang lebih kecil dari 30° akan menghasilkan lapisan

darah yang tipis dan sebaliknya pergeseran yang cepat atau sudut yang lebih besar dari 30° akan menghasilkan lapisan darah yang tebal. Leukosit-leukosit tidak boleh menggerombol di bagian dari hapusan (*feather edge*). Bila ini terjadi maka distribusi dari macam-macam leukosit tidak representatif. Gerakan yang terlalu pelan atau *deck glass* yang kotor dapat menyebabkan kesalahan ini. Mengeringkan hapusan dengan segera penting sekali. Bila tidak leukosit-leukosit akan mengkerut.

Prosedur pengecatan hapusan darah.

Hapusan yang sudah kering difiksasi dengan meneteskan cat *Giemsa* pada hapusan darah, sehingga tertutup seluruhnya. Waktu fiksasi ± 2 menit. Pengecatan dilakukan dengan meneteskan larutan buffer yang sama banyaknya pada cat *Giemsa* tadi. Buffer dan cat *Giemsa* segera dicampur dengan jalan meniup-niup beberapa kali. Tunggu ± 20 menit agar sel-sel tercat dengan baik dan terbentuk *Metallic Scum*. Hapusan dicuci dengan aquades atau air biasa dengan cara menuangkan aquades pada hapusan yang berada di atas rak sehingga semua cat hanyut. Hapusan diletakkan pada sisinya dan ditunggu sampai kering. Jangan mengeringkan hapusan di atas kertas saring, kapas dan sebagainya.

Prosedur pemeriksaan hapusan darah.

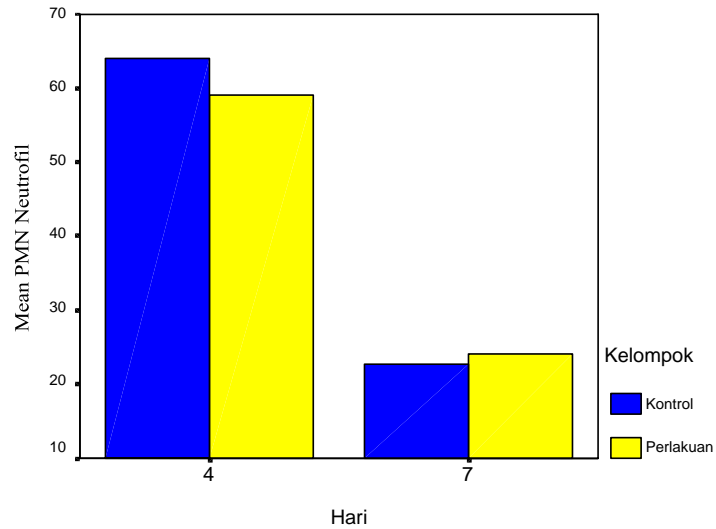
Pemeriksaan hapusan darah terdiri atas: (1) pemeriksaan dengan pembesaran kecil (100x) untuk menilai kualitas hapusan darah, menafsirkan jumlah leukosit dan memeriksa apakah sel-sel normal; (2) pemeriksaan dengan pembesaran besar (1000x) untuk menghitung differensial leukosit dan mencari kelainan-kelainan morfologis.

HASIL

Tabel 1. Hasil penghitungan jumlah PMN pada hari ke-4 dan ke-7

No	Hari ke-4		Hari ke-7	
	Kelompok Kontrol	Kelompok Perlakuan	Kelompok Kontrol	Kelompok Perlakuan
1	64	58	31	30
2	61	56	23	24
3	64	58	27	17
4	59	57	23	27
5	63	62	19	32
6	69	57	23	17
7	74	60	17	21
8	59	54	18	25
Mean	64,1250	59,0000	22,6250	24,1250
SD	5,1391	4,3753	4,7189	5,5662

Keterangan: SD = Standard Deviasi
Mean = Rata-rata jumlah



Gambar 1. Histogram rerata jumlah PMN

Tabel tersebut memperlihatkan rerata jumlah PMN kedua kelompok pada hari ke-4 lebih banyak daripada hari ke-7. Rerata jumlah PMN kelompok kontrol pada hari ke-4 lebih banyak daripada kelompok perlakuan. Sedangkan rerata jumlah PMN kelompok kontrol pada hari ke-7 lebih sedikit daripada kelompok perlakuan. Hal ini dapat terlihat lebih jelas pada Gambar 1.

Data penelitian diuji distribusinya menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov

dengan hasil didapatkan nilai signifikansi $>0,05$ yang berarti data penelitian berdistribusi normal (Tabel 2). Hasil uji homogenitas data menunjukkan nilai signifikansi $>0,05$ yang berarti data ditarik dari varian yang sama atau homogen (Tabel 3).

Selanjutnya data dianalisis menggunakan *independent t-test* yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4 dan 5.

Tabel 2. Hasil uji normalitas

Kelompok	Asymp.sig.(2-tailed)	
	Hari ke-4	Hari ke-7
Kontrol	0,653	0,840
Perlakuan	0,852	0,994

Tabel 3. Hasil uji homogenitas

	Levene statistik	Sig
Hari ke-4	0,085	0,774
Hari ke-7	0,373	0,551

Tabel 4. Hasil *independent t-test* jumlah PMN hari ke-4 dan ke-7

	Kontrol	Perlakuan
Sign. (2-tailed)	0,0000	0,0000

Tabel 5. Hasil *independent t-test* jumlah PMN kelompok kontrol dan perlakuan

	Hari ke-4	Hari ke-7
Sign. (2-tailed)	0,050	0,570

Tabel 4 menunjukkan bahwa jumlah PMN kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan pada hari ke-4 dibandingkan hari ke-7 mempunyai perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Jumlah PMN kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari ke-4 lebih banyak daripada hari ke-7. Tabel 5 menunjukkan bahwa jumlah PMN kelompok kontrol dibandingkan kelompok perlakuan pada hari ke-4 maupun hari ke-7 tidak ada perbedaan yang signifikan ($p \geq 0,05$); dapat diartikan jumlah PMN kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari ke-4 maupun hari ke-7 dianggap sama.

DISKUSI

Gingiva sehat dapat mengalami peradangan karena adanya bakteri plak. Dalam menimbulkan kerusakan, bakteri harus berkolonisasi pada leher gingiva dengan menyerang pertahanan hospes, merusak barrier krevikular atau memproduksi substansi yang dapat menimbulkan kerusakan jaringan baik secara langsung maupun tidak langsung. Kemampuan bakteri untuk menyerang pertahanan hospes antara lain: menyebabkan kerusakan langsung pada PMN dan makrofag, mengurangi khemotaksis PMN, degradasi imunoglobulin, degradasi fibrin dan merubah fungsi limfosit.¹⁰

Radang gingiva pada penelitian ini dipicu dengan adanya ligasi atau pengikatan dengan *wire* pada leher gigi insisivus bawah dari hewan coba (tikus Wistar jantan). Ikatan tersebut dipakai selama periode penelitian dan digunakan sebagai alat retensi bagi bakteri plak¹¹; dengan demikian akan terjadi akumulasi bakteri plak yang pada akhirnya dapat memudahkan timbulnya radang gingiva. Perkembangan radang gingiva terjadi dalam beberapa tahapan yaitu: *initial lesion* yang terjadi dalam waktu 4 hari setelah akumulasi plak dimulai, *early lesion* yang terjadi dalam waktu 7 hari, *established lesion* yang terjadi dalam waktu 2-3 minggu dan *advanced lesion* bila lesi sudah meluas ke tulang alveolar.¹²

Hasil analisis data menunjukkan bahwa jumlah PMN kelompok kontrol maupun perlakuan pada hari ke-4 lebih banyak dibandingkan hari ke-7. Jadi secara keseluruhan rata-rata jumlah PMN masing-masing kelompok semakin menurun. Hal ini disebabkan pada hari ke-4 proses peradangan sudah masuk tahap *initial lesion*. Pada tahap ini belum ada tanda klinis peradangan, tetapi sudah terjadi perubahan vaskular yaitu dilatasi kapiler dan peningkatan aliran darah. Sel darah putih terutama PMN meninggalkan kapiler dengan jalan migrasi melalui dinding kapiler sehingga PMN banyak dijumpai pada jaringan ikat di bawah *junctional epithelium* dan sulkus gingiva.¹² PMN menjadi sel pertahanan yang pertama kali muncul, sebagian besar disebabkan oleh mobilitasnya yang tinggi dan juga karena PMN terdapat dalam jumlah banyak pada

sirkulasi darah. Selain itu faktor lain yang mempengaruhi adalah PMN telah aktif pada awal reaksi radang.⁴ Sel ini mempunyai banyak lisosom untuk mencernakan bakteri dan sel-sel yang sudah tidak berguna lagi dan berumur pendek.¹³

Jumlah PMN pada hari ke-7 lebih sedikit dibandingkan hari ke-4 karena proses peradangan sudah masuk tahap *early lesion*. Pada tahap ini tanda klinis eritema mulai tampak terutama karena adanya proliferasi kapiler dan meningkatnya pembentukan lengkungan-lengkungan kapiler diantara *rete pegs*. Selain itu dengan *probing* mungkin juga terjadi perdarahan. Pemeriksaan histologis menunjukkan adanya infiltrasi sel darah putih pada jaringan ikat di bawah *junctional epithelium* terutama dari jenis limfosit (kira-kira 75% dengann sebagian besar sel T) dan sisanya beberapa PMN, makrofag, sel plasma dan sel mast.¹²

Jumlah PMN kelompok kontrol dibandingkan kelompok perlakuan pada hari ke-4 maupun hari ke-7 tidak ada perbedaan yang signifikan. Hal ini berarti bahwa keberadaan *E. gingivalis* pada keadaan radang gingiva tidak mempengaruhi jumlah PMN baik pada tahap *initial lesion* maupun *early lesion*. Meskipun menurut Bonner dan Lyons organisme ini dapat memfagosit sel darah putih, namun tidak dijelaskan apakah *E. gingivalis* memfagosit sel darah putih jenis PMN. *E. gingivalis* tidak memfagosit PMN kemungkinan karena sel ini mempunyai mobilitas yang tinggi dan terdapat dalam jumlah yang banyak dalam sirkulasi darah. Per milimeter kubik darah terdapat kira-kira 5000 PMN. Sekitar 100 kali dari jumlah tersebut tertahan dalam sumsum tulang sebagai bentuk matang yang siap untuk dikeluarkan apabila ada sinyal.⁵ Pada peradangan supaya keadaan seimbang tetap terpelihara terdapat beberapa tuntutan PMN yang matang menggantikan yang hilang di jaringan yang rusak dengan memelihara ukuran granulosit total.¹⁴

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini adalah bahwa pemaparan *E. gingivalis* tidak mempengaruhi jumlah PMN pada tikus Wistar jantan dengan radang gingiva.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jawetz, E., Melnick, J. L., Alberg, E. A. Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan. Terjemahan Edi Nugroho dan R.F. Maulany dari Medical Microbiology. Jakarta: EGC. 1991.
2. Roberts, L. S., Schimdt, G. D. Foundations of Parasitology. Seventh Edition. Singapura: Mc Graw Hill. 2000.

3. Mardijana, Alif. Parasitologi Kedokteran Cestoda Protozoa. Jember: PSKG Universitas Jember. 1996.
4. Robbins, S. L., Kumar, V. Buku Ajar Patologi I. Terjemahan Staf Pengajar Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dari Basic Pathology Part I. Jakarta: EGC. 1995.
5. Price, S. A., Wilson, L. M. C. Patofisiologi Konsep Klinik Proses-proses Penyakit. Edisi Keempat. Terjemahan Adji Dharma dkk. dari Patophysiology Clinical Concept of Disease Processes. Jakarta: EGC. 1994.
6. Bloom, J.P., Fawcett, I. Histologi. Edisi Kesatu. Terjemahan Ronardi Devy H. dari Histology. Jakarta: EGC. 2002.
7. Junquiera, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. Histologi Dasar. Edisi Kedelapan. Terjemahan Jan Tambajong dari Basic Histology. Jakarta: EGC. 1997.
8. Lyons, T. About *Entamoeba gingivalis*. <http://www.magma.ca/~amoeba/about%20Entamoeba%20gingivalis.htm>. 2005. Diakses tanggal 18 Oktober 2005.
9. Bonner, M. *Entamoeba gingivalis*, a Pathogen Similar to *Entamoeba histolytica*. <http://homepages.isthm.ac.uk/entamoeba/embo/bonner.htm>. 2005. Diakses tanggal 19 Oktober 2005.
10. Eley, B. M. and Manson, J. D. Periodontics. 5th edition. Edinburgh: Wright. 2004.
11. Takada, T. Effect of Restraint Stress on the Progression of Experimental Periodontitis in Rats. *Journal of Periodontology*, 2004; 75 (2): 306-15.
12. Newman, M. G., Takei, H. H., Klokkevold, P. R., Carranza, F. A. Carranza's Clinical Periodontology. 10th edition. St. Louis: Saunders Elsevier. 2006.
13. Lawler, W., Ahmed, A., William, J.H. Patologi untuk Kedokteran Gigi. Terjemahan Agus Djaya dari Essential Pathology for Dental Student. Jakarta: EGC. 1992.
14. Spector, W. G., Spector, T. D. Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik. Terjemahan Soetjipto dkk. Dari Principles and Procedures of Statistics. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. 1993.