

**PERBEDAAN JUMLAH mRNA RESEPTOR OPIOID μ ,
 δ , DAN κ ANTARA GIGI SENSITIF DAN GIGI
TIDAK SENSITIF**

Oleh :

Sheila Soesanto

NIM: 144150203

TESIS INI DIAJUKAN UNTUK MEMENUHI SEBAGIAN
PERSYARATAN GUNA MEMPEROLEH GELAR
MAGISTER KEDOKTERAN GIGI



PROGRAM STUDI
MAGISTER ILMU KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS TRISAKTI
2018

**PERBEDAAN JUMLAH mRNA RESEPTOR OPIOID μ ,
 δ , DAN κ ANTARA GIGI SENSITIF DAN GIGI
TIDAK SENSITIF**

Oleh :

Sheila Soesanto

NIM: 144150203

TESIS INI DIAJUKAN UNTUK MEMENUHI SEBAGIAN
PERSYARATAN GUNA MEMPEROLEH GELAR
MAGISTER KEDOKTERAN GIGI



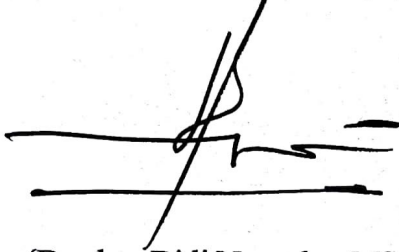
PROGRAM STUDI
MAGISTER ILMU KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS TRISAKTI
2018

**PERBEDAAN JUMLAH mRNA RESEPTOR OPIOID μ ,
 δ , DAN κ ANTARA GIGI SENSITIF DAN
GIGI TIDAK SENSITIF**

Telah diperiksa dan disetujui

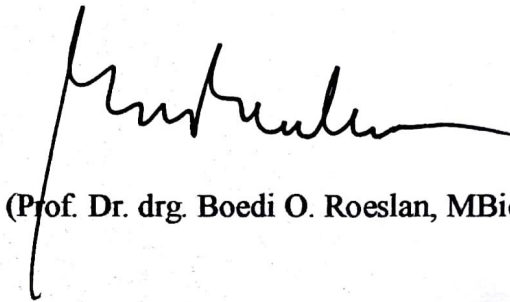
23 April 2018

Pembimbing Utama,



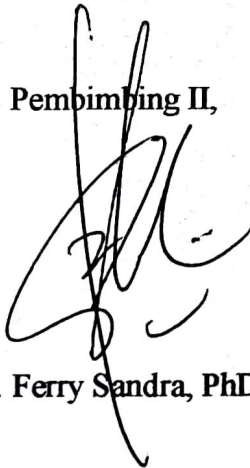
(Dr. drg. Didi Nugroho, MSc)

Pembimbing I,



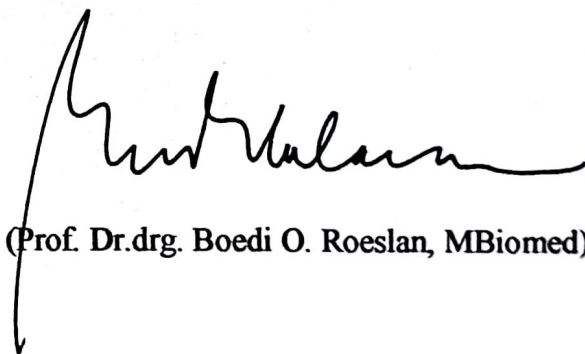
(Prof. Dr. drg. Boedi O. Roeslan, MBIomed)

Pembimbing II,



(drg. Ferry Sandra, PhD)

Kepala Program Magister Ilmu Kedokteran Gigi,



(Prof. Dr.drg. Boedi O. Roeslan, MBIomed)

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Tuhan untuk semua berkat dan perlindungan-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “PERBEDAAN JUMLAH mRNA RESEPTOR OPIOID μ , δ , DAN κ ANTARA GIGI SENSITIF DAN GIGI TIDAK SENSITIF”. Hanya dengan kemurahan Tuhan sajalah tesis ini dapat berjalan dengan baik. Seluruh peristiwa suka dan duka yang penulis alami dalam penyelesaian tesis ini merupakan bukti bahwa Tuhan membuat segala sesuatu indah pada waktuNya.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih pada segenap pimpinan FKG Usakti yang sudah memberikan penulis kesempatan untuk menempuh pendidikan Program Pasca Sarjana Magister Ilmu Kedokteran Gigi Universitas Trisakti dan membiayai pendidikan ini. Terima kasih juga untuk semua kemudahan yang diberikan pada penulis hingga akhirnya penulis dapat menyelesaikan pendidikan ini dengan baik. Semoga ilmu yang penulis dapatkan dapat penulis kembalikan untuk memajukan FKG Usakti.

Rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis hanturkan kepada Dr. drg. Didi Nugroho Santosa, MSc selaku pembimbing utama yang telah memberikan ide penelitian dan berbagai masukan yang sangat berharga dalam penulisan tesis ini. Terima kasih untuk waktu yang telah drg. Didi luangkan untuk membahas penelitian ini di tengah kesibukan yang ada, bahkan di tengah hari libur pun drg. Didi siap sedia berdiskusi dengan penulis. Penulis sangat menghargai budi baik drg. Didi untuk senantiasa mendukung penulis di waktu penulis mengalami hambatan.

Terima kasih juga penulis hanturkan kepada Prof. Dr. drg. Boedi O. Roeslan, MBiomed selaku pembimbing pertama yang selalu siap sedia berdiskusi, bahkan sewaktu sedang sakit pun Prof. Boedi tetap menyempatkan diri untuk mendengarkan kesulitan dan memberi jalan keluar bagi penulis. Semoga Tuhan membalas Prof. Boedi untuk semua dukungan, semangat, dan pengertian yang diberikan untuk penulis selama sedang menempuh pendidikan. Terima kasih juga Prof. Boedi untuk menjadi pengajar yang selalu tepat waktu tanpa pernah absen

dalam memberikan kuliah. Di saat kami hilang arah, Prof. Boedi selalu membawa terang dan berjuang keras untuk kami. Prof. Boedi bagaikan ayah selama kami menempuh pendidikan S2 ini.

Kepada drg. Ferry Sandra, PhD selaku pembimbing kedua, penulis hanturkan segenap terima kasih untuk semua pengetahuan dan ilmu yang drg. Ferry berikan dalam pengerjaan penelitian di laboratorium. Penulis mendapatkan banyak hal baru yang menarik yang membuat penulis menyukai pekerjaan laboratorium di bawah arahan drg. Ferry.

Terima kasih penulis hanturkan pada Sheila Sutanto, SSi dan Nanda Agus Ahsani Taqwin, SSi yang sudah berdedikasi tinggi membantu penulis dalam pengerjaan laboratorium. Terima kasih untuk tidak pernah kenal lelah dan selalu siap sedia bekerja tanpa kenal waktu. Terima kasih secara khusus pada Mas Nanda yang telah menyempatkan datang untuk membantu penulis di tengah kesibukan Mas Nanda yang padat dan menyita hari libur Mas Nanda. Penulis sangat menghargai pengorbanan dan berbagai ilmu yang sudah diberikan untuk penulis.

Terima kasih juga penulis hanturkan pada drg. Himawan Halim, DMD, MS, FICD, Sp.Ort, Dr. drg. Harryanto Wijaya, MKes, dan drg. Tutie M. Jatim, Sp.Ort yang sudah membantu penulis dalam pengumpulan sampel penelitian yang dibutuhkan. Terima kasih secara khusus pada drg. Himawan yang banyak memberikan sampel dan kepercayaan penuh pada penulis untuk berinteraksi dengan pasien, serta untuk para seluruh perawat di klinik drg. Himawan yang membantu penulis dengan senang hati.

Kepada Dr. drg. Armelia Sari Widyarman, MKes, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya untuk waktu yang diberikan bagi penulis untuk mendiskusikan hasil penelitian dalam waktu yang sempit. Meskipun drg. Sari bukan merupakan pembimbing penulis, namun bantuan yang diberikan pada penulis sungguh luar biasa. Penulis sangat menghargai kesediaan drg. Sari untuk membagikan ilmu pada penulis.

Penulis juga berterimakasih kepada penguji tesis Prof. Dr. drg. Loes Sjahrudin, MKes, Dr. drg. Trijani, Sp.Perio, Dr. drg. Tien Suwartini, Sp.KG(K), serta Dr. drg. Didi Nugroho Santosa, MSc atas masukan dan ilmu yang diberikan

dalam perbaikan tesis ini sehingga penulis dapat menulis dengan lebih baik lagi di masa yang akan datang.

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada seluruh staf pengajar Program Pasca Sarjana Magister Ilmu Kedokteran Gigi Universitas Trisakti atas semua ilmu, waktu, bimbingan dan saran yang telah diberikan untuk penulis.

Untuk Dr. drg. Joko Kusnoto, MS, Sp.Ort, terima kasih dari hati yang paling dalam untuk semua cinta, perhatian, dan pengertian yang diberikan pada penulis selama penulis menempuh pendidikan. Terima kasih juga untuk dukungan pada penulis dalam memberikan sampel penelitian terbanyak sehingga penelitian penulis dapat berjalan dengan lancar. Terima kasih untuk tidak bosan-bosannya mendengarkan keluh kesah penulis dan selalu siap memberikan jalan keluar yang logis dalam tiap masalah yang dihadapi penulis. Untuk Ariel Kusnoto dan Alyssa Kusnoto tercinta, terima kasih atas kasih sayang dan perhatian yang kalian berikan selama penulis menjalani pendidikan ini. Kalian berdua tidak kenal lelah memberikan semangat dan melewati suka dan duka bersama-sama penulis. Semoga gelar yang didapat penulis dapat menjadi bukti bagi kalian bahwa tidak ada batasan usia dalam menempuh pendidikan selama kita mau dan ikhlas menjalaninya. Tetap berusaha menyerahkan yang terbaik dari diri kita dan biarkan Tuhan menetapkan bagaimana akhirnya.

Untuk kedua orangtua tercinta, Ir. Hery Soesanto dan Andajani Adinata. Rasa hormat dan terima kasih tidak terhingga penulis persembahkan untuk semua cinta, perhatian, dan dukungan yang diberikan dari penulis ada di dunia hingga kini penulis berhasil meraih gelar Magister Kedokteran Gigi. Sudah layak dan sepatutnya gelar ini penulis persembahkan untuk papi dan mami tercinta untuk semua kerja keras yang sudah papi dan mami berikan pada penulis hingga menjadi seorang dokter gigi. Sampai kapanpun penulis tidak dapat membalas semua yang sudah diberikan papi dan mami pada penulis.

Rasa hormat dan terima kasih juga penulis hanturkan pada Dr. drg. Kartika Wangsarahardja, MPd atas doa dan semangat yang tak kunjung padam yang diberikan pada penulis selama ini. Penulis juga yakin bahwa pendidikan ini dapat selesai tak lain karena doa (alm.) Prof. Dr. drg. Hendro Kusnoto, Sp.Ort yang

selalu menyertai penulis. Semoga gelar ini dapat membuat Papi di surga dan mami bangga karena setelah tahun-tahun berlalu, akhirnya penulis mau melanjutkan pendidikan dan berhasil mendapatkan gelar Magister Kedokteran Gigi.

Terima kasih juga penulis haturkan untuk Susana Sung, SE yang sudah menjadi teman terbaik penulis dan selalu ada kapan saja untuk penulis. Penulis sangat menghargai untuk pemberian semangat yang tidak pernah habis dan untuk semua bantuan yang diberikan pada penulis.

Untuk teman seperjuangan, drg. Monica Dewi Ranggaini dan drg. Elizabeth Cynthia, akhirnya kita telah sampai pada garis *finish*. Semua suka, duka, dan kebersamaan yang kita alami akan menjadi kenangan yang tidak terlupakan bagi penulis.

Akhir kata, penulis menyampaikan terima kasih kepada seluruh pihak yang sudah membantu dan tidak dapat disebutkan satu-persatu dalam menyelesaikan tugas akhir ini. Permohonan maaf juga penulis haturkan bila terjadi kesalahan maupun kekurangan dalam penelitian ini. Semoga penelitian ini dapat membuka wawasan bagi kita semua dan menginspirasi penelitian-penelitian baru yang lebih baik. *Ad Maiorem Dei Gloriam!*

Jakarta, April 2018

DAFTAR ISI

	halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	v
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR SINGKATAN	x
DAFTAR LAMBANG	xii
ABSTRAK.....	xiii
<i>ABSTRACT</i>	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Nyeri.....	5
B. Inervasi Pulpa.....	8
C. Sensitivitas Gigi	10
D. Neuropeptida Nosisseptif.....	12
E. Peptida Opioid Endogen	13
F. Reseptor Opioid	15
G. Metode Pemeriksaan Sensitivitas Pulpa.....	16
H. <i>Real-time Reverse Transcript-Polymerase Chain Reaction</i>	21
BAB III. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS	
A. Kerangka Teori.....	27
B. Kerangka Konsep	30
C. Hipotesis.....	30

BAB IV. METODE PENELITIAN	
A. Jenis dan Rancangan Penelitian	31
B. Tempat dan Waktu Penelitian	31
C. Subjek Penelitian.....	31
D. Sampel Penelitian.....	31
E. Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	32
F. Variabel Penelitian	32
G. Definisi Operasional Variabel.....	33
H. Alat dan Bahan.....	34
I. Cara Kerja	35
J. Analisis Data	39
BAB V. HASIL PENELITIAN	
A. Deskripsi Data.....	40
B. Analisis Statistik	44
BAB VI. PEMBAHASAN.....	46
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. KESIMPULAN	49
B. SARAN	49
SUMMARY	50
DAFTAR PUSTAKA	53

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1. Surat Persetujuan Etik.....	57
Lampiran 2. Lembar Penjelasan Penelitian.....	58
Lampiran 3. Lembar Persetujuan Subjek Penelitian (<i>Informed Consent</i>).....	60
Lampiran 4. Uji Normalitas.....	61
Lampiran 5. Uji Beda.....	62

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 1. Kategori ekspresi mRNA dan skor berdasarkan nilai Ct.	25
Tabel 2. Kuantifikasi relatif mRNA MOR pada gigi sensitif dan gigi tidak sensitif menggunakan metode $\Delta\Delta Ct$	42
Tabel 3. Kuantifikasi relatif mRNA KOR pada gigi sensitif dan gigi tidak sensitif menggunakan metode $\Delta\Delta Ct$	43
Tabel 4. Kuantifikasi relatif mRNA DOR pada gigi sensitif dan gigi tidak sensitif menggunakan metode $\Delta\Delta Ct$	44
Tabel 5. Kategori ekspresi mRNA MOR, KOR, dan DOR berdasarkan nilai rerata Ct	44

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 1. Mekanisme nyeri nosiseptif	7
Gambar 2. Mekanisme aktivasi serabut saraf intradental.	9
Gambar 3. <i>Electric Pulp Tester</i>	18
Gambar 4. Kurva sigmoid hasil amplifikasi pada RT-PCR	24
Gambar 5. Kerangka teori	29
Gambar 6. Alur penelitian	38
Gambar 7. Hasil amplifikasi GAPDH sebagai <i>housekeeping gene</i> (A) dan <i>melting curve</i> GAPDH (B)	40
Gambar 8. Hasil amplifikasi mRNA MOR (A) dan <i>melting curve</i> mRNA MOR (B)	41
Gambar 9. Hasil amplifikasi mRNA KOR (A) dan <i>melting curve</i> mRNA KOR (B)	42
Gambar 10. Hasil amplifikasi mRNA DOR (A) dan <i>melting curve</i> mRNA DOR (B)	43

DAFTAR SINGKATAN

ABI	: <i>Applied Biosystems</i>
AMP	: <i>adenosine monophosphate</i>
Ca ²⁺	: <i>calcium</i>
cAMP	: <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
cDNA	: <i>complimentary deoxyribonucleic acid</i>
CGRP	: <i>calcitonin gene-related peptide</i>
CN	: <i>central nucleus</i>
CO ₂	: <i>carbondioxide</i>
CP	: <i>crossing point</i>
Ct	: <i>cycle threshold</i>
CYP2D6	: <i>cytochrome P450 family 2 subfamily D member 6</i>
DDM	: <i>diklorodifluorometan</i>
DNA	: <i>deoxyribonucleic acid</i>
DOR	: <i>delta opioid receptor</i>
DOR	: <i>delta opioid receptor (duplo)</i>
dsDNA	: <i>double-stranded deoxyribonucleic acid</i>
EPT	: <i>Electric Pulp Tester</i>
GAPDH	: <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
IL-1	: <i>interleukin-1</i>
K ⁺	: <i>kalium</i>
KOR	: <i>kappa opioid receptor</i>
KORd	: <i>kappa opioid receptor (duplo)</i>
MOR	: <i>mu opioid receptor</i>
MORd	: <i>mu opioid receptor (duplo)</i>
mRNA	: <i>messenger ribonucleic acid</i>
Na ⁺	: <i>natrium</i>
NKA	: <i>neurokinin A</i>
NPY	: <i>neuropeptida Y</i>

OPRM	: <i>opioid receptor mu</i>
PAG	: <i>periaqueductal gray</i>
PBS	: <i>phosphate buffer saline</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGE2	: <i>prostaglandin E2</i>
PGK	: <i>phosphoglycerate kinase</i>
Pre-POMC	: <i>prepro-opiomelanokortin</i>
Q-rt-RT-PCR	: <i>quantitative real-time Reverse Transcript-Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	: <i>ribonucleic acid</i>
RT	: <i>Reverse Transcript</i>
RVM	: <i>Rostral Ventromedial Medulla</i>
SD	: <i>standar deviasi</i>
SP	: <i>substansi P</i>
SSP	: <i>Susunan Saraf Pusat</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRPV1	: <i>Transient Receptor Potential Vanilloid receptor type 1</i>
VIP	: <i>Vasoactive Intestinal Peptide</i>
VMN	: <i>ventromedial nucleus</i>

DAFTAR LAMBANG

%	: persen
$\Delta\Delta$: delta delta
μl	: mikroliter
m/detik	: meter per detik
n	: jumlah sampel
ng	: nanogram
$^{\circ}\text{C}$: derajat Celcius
$Z\alpha$: derivat baku normal untuk α
$Z\beta$: derivat baku normal untuk β
α	: alfa
β	: beta
γ	: gamma
δ	: delta
κ	: kappa
μ	: mu
σ	: sigma

ABSTRAK

Latar belakang: Dalam praktek dapat dijumpai perbedaan sensitivitas gigi terhadap nyeri. Ada pasien dengan karies kecil sudah merasa nyeri, sebaliknya ada yang mengalami *painless pulpitis*. *Painless pulpitis* sering tidak terdeteksi karena pasien tidak merasakan nyeri sebelumnya. Hal ini diduga terjadi karena adanya efek analgesia akibat modulasi rangsang nyeri di perifer sebelum mencapai korteks serebri. Pada modulasi nyeri, peptida opioid endogen berikatan dengan reseptor opioid μ (MOR), δ (DOR), dan κ (KOR) untuk meredakan nyeri. **Tujuan:** mengkonfirmasi keberadaan MOR dan mengetahui ada tidaknya DOR dan KOR pada pulpa gigi manusia, serta mengetahui perbedaan jumlah mRNA MOR, KOR, dan DOR antara gigi sensitif dan gigi tidak sensitif. **Metode:** penelitian eksploratif dan observasional dengan rancangan potong silang digunakan untuk meneliti pulpa gigi premolar satu bawah yang sehat dari pasien ortodonti usia 12-18 tahun. Dari pengukuran tingkat sensitivitas gigi menggunakan *Electric Pulp Tester* (EPT) didapatkan 5 gigi tidak sensitif dan 4 gigi sensitif. Dilakukan ekstraksi mRNA pulpa sampel dan amplifikasi untuk mengetahui jumlah mRNA MOR, DOR, dan DOR dengan menggunakan Q-rt-RT-PCR. Penelitian ini menggunakan SYBR Green untuk kuantifikasi *double stranded DNA* dan GAPDH sebagai *housekeeping gene*. **Hasil penelitian:** Ditemukan MOR, KOR, DOR pada pulpa manusia. Ekspresi mRNA MOR, KOR, dan DOR gigi sensitif mengalami *downregulated* sebanyak 0,95; 0,77, dan 0,97 kali terhadap gigi tidak sensitif. **Kesimpulan:** Untuk pertama kalinya, ditemukan keberadaan KOR dan DOR pada pulpa, namun tidak ada perbedaan jumlah mRNA MOR, KOR, dan DOR pada gigi sensitif dan gigi tidak sensitif.

Kata kunci: mRNA reseptor opioid, MOR, KOR, DOR, Q-rt-RT-PCR, *Electric Pulp Tester*, sensitivitas gigi

ABSTRACT

Background : Dentists often found various pain sensitivity level in their patients. Some people experience severe pain with small caries, while others have painless pulpitis. Patients are having difficulties to detect painless pulpitis since they do not feel any pain before. This phenomenon occurs due to peripheral pain modulation before it reaches cerebral cortex. Endogenous opioid peptides will bind to and activate μ (MOR), δ (DOR), dan κ (KOR) opioid receptors to produce analgesia. **Objective:** to determine the expression pattern of MOR, KOR, and DOR in human dental pulp between sensitive and non-sensitive teeth. **Method:** this is an explorative-observational study with cross sectional method, using mandibular healthy first premolar from orthodontic patient aged 12-18 years. Five non-sensitive teeth and four sensitive teeth were selected after sensitivity test using Electric Pulp Tester (EPT). mRNA were extracted from each sample and amplified using Q-rt-RT-PCR. This study used SYBR Green as a dye for the quantification of double stranded DNA and GAPDH as a housekeeping gene. **Result :** mRNA MOR, KOR, and DOR expression were detected in all sample. The expression of mRNA MOR, KOR, and DOR are 0,95; 0,77, and 0,97 fold lower in sensitive teeth relative to non-sensitive teeth. **Conclusion:** This study reports the presence of KOR and DOR for the first time in human dental pulp. There is no significant difference of mRNA MOR, KOR, and DOR quantification between sensitive and non-sensitive teeth.

Keywords: mRNA opioid receptor, MOR, KOR, DOR, Q-rt-RT-PCR, Electric Pulp Tester, teeth sensitivity

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Nyeri adalah perasaan tidak nyaman yang mempengaruhi unsur sensorik, respon emosional, hubungan sosial, perubahan sikap, faktor kognitif, dan motivasi. Nyeri yang merupakan alasan pasien mencari pertolongan adalah sebuah sensasi subjektif, sehingga sulit meneliti nyeri secara kuantitatif pada manusia.¹

Banyak orang mengasosiasikan kedokteran gigi dengan nyeri sehingga pasien menunda perawatan, tidak mempedulikan gejala awal nyeri gigi, dan baru datang ke dokter gigi setelah mengalami nyeri yang tidak tertahankan. Asosiasi ini terjadi berdasarkan pengalaman nyeri sebelumnya atau pengalaman yang melibatkan stimulasi nosiseptor gigi selama perawatan gigi. Oleh karena itu, dokter gigi memerlukan kemampuan diagnosis dan penatalaksanaan nyeri terhadap keluhan pasien sehingga asosiasi antara nyeri dan kedokteran gigi dapat dihindari.²

Nyeri gigi dapat terjadi karena stimulasi fisik yang tajam akibat pergerakan cairan dentin yang mengaktivasi nosiseptor pada tubuli dental.² Selain itu, pelepasan mediator inflamasi dapat menstimulasi reseptor yang terletak pada serabut saraf aferen nosiseptif sehingga menimbulkan nyeri.² Pulpa manusia diinervasi oleh serabut saraf sensorik yang terletak pada ujung aferen dari nervus trigeminus.³ Serabut saraf ini terdiri dari serabut saraf C yang tidak bermielin dan serabut saraf A yang bermielin. Adanya bakteri, rangsangan kimia, termal, erosi mekanik pada email dan resesi gingiva, menyebabkan reseptor dan kanal ion di perifer akan mendeteksi dan merespon rangsangan tersebut sebagai suatu alarm bagi tubuh.¹ Kedua tipe serabut saraf sensorik ini akan menghasilkan neuropeptida nosiseptif, seperti substansi P (SP) dan *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) yang akan menyebabkan terjadinya inflamasi neurogenik dan membangkitkan respon imun, seperti pelepasan

histamin, kemotaksis, fagositosis, dan sintesis mediator inflamasi lainnya, termasuk sitokin.⁴ Pada inflamasi pulpa, konsentrasi SP jauh lebih besar daripada konsentrasi CGRP, sehingga SP merupakan neuropeptida yang sangat berperan dalam proses inflamasi pulpa.⁵ Peningkatan konsentrasi neuropeptida ini menyebabkan timbulnya nyeri secara spontan, alodinia, atau hiperalgesia.⁶

Namun demikian, dalam praktek sehari-hari sering dijumpai pasien yang sensitif maupun yang tidak sensitif terhadap nyeri. Ada pasien yang dengan karies kecil sudah merasa nyeri, sebaliknya ada yang mengalami *painless* pulpitis atau pulpitis ireversibel asimtomatik. Pulpitis ireversibel asimptomatik adalah diagnosis berdasarkan penemuan subjektif dan objektif yang menunjukkan pulpa vital yang mengalami inflamasi namun tidak dapat sembuh dan memerlukan perawatan saluran akar. Gigi menunjukkan respon normal pada tes termal namun ditemukan adanya karies dalam yang mengarah pada terbukanya ruang pulpa.⁷ Perubahan vaskular, neural, selular, dan biokimia akibat inflamasi dapat terus berjalan tanpa adanya nyeri, sehingga bila tidak diberikan perawatan, maka gigi akan mengalami nekrosis.⁸ Keadaan ini tidak terdeteksi karena pasien sama sekali tidak merasakan nyeri sebelumnya. Diduga pasien mengalami *painless* pulpitis karena adanya efek analgesia akibat modulasi rangsang nyeri dari perifer sebelum mencapai korteks serebri.² Perbedaan sensitivitas ini dapat menimbulkan masalah bagi dokter gigi dalam menegakkan diagnosis dan membuat rencana perawatan.

Pada modulasi nyeri, aktivitas nosiseptor pada pulpa diredam oleh mediator penghambat lokal seperti peptida opioid endogen dan kanabinoid. Peptida opioid endogen adalah neurotransmiter dan neuromodulator yang diproduksi secara alami dalam jumlah besar oleh otak dan sumsum tulang belakang untuk menekan nyeri. Ada tiga kelompok peptida opioid yang dihasilkan tubuh, yaitu endorfin, enkefalin, dan dinorfin.⁹ Peptida opioid endogen akan berinteraksi dengan reseptor opioid yang terletak pada neuron aferen primer untuk mengurangi transmisi nyeri dengan mencegah pengeluaran neurotransmiter SP.³ Tiap peptida opioid endogen tidak berikatan secara

spesifik dengan satu reseptor opioid, namun berikatan dengan berbagai reseptor opioid, seperti reseptor opioid μ , δ , dan κ dalam meredam nyeri.⁹

Untuk memahami modulasi nyeri di perifer, berbagai penelitian telah membahas mengenai peranan peptida opioid endogen dan reseptor opioid pada jaringan di perifer.^{8,10-12} Telah ditemukan pula adanya reseptor opioid μ yang tersebar pada bagian koronal dan apikal pulpa molar gigi manusia.¹³ Bahkan untuk mengetahui peranan ketiga reseptor opioid terhadap transmisi saraf, telah dilakukan penelitian tentang pola distribusi reseptor opioid pada berbagai jaringan tubuh manusia, seperti otak, paru-paru, ginjal, hati, jantung, timus, usus kecil, pankreas, dan kelenjar adrenal melalui penghitungan mRNA reseptor opioid μ , δ , dan κ secara kuantitatif menggunakan *quantitative real-time RT-PCR*. Namun demikian, penelitian serupa belum pernah dilakukan pada pulpa manusia.¹⁴ Selain itu, reseptor opioid δ baru ditemukan pada molar tikus, namun pada pulpa manusia belum ditemukan adanya reseptor opioid δ dan κ .¹⁵ Oleh karena itu, untuk memahami peranan ketiga reseptor opioid terhadap sensitivitas gigi, maka perlu diketahui apakah ada perbedaan jumlah mRNA reseptor opioid μ , δ , dan κ antara gigi sensitif dan gigi tidak sensitif.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah dalam pulpa gigi manusia terdapat reseptor opioid μ , δ , dan κ ?
2. Apakah ada perbedaan jumlah mRNA reseptor opioid μ antara gigi sensitif dan gigi tidak sensitif?
3. Apakah ada perbedaan jumlah mRNA reseptor opioid δ antara gigi sensitif dan gigi tidak sensitif?
4. Apakah ada perbedaan jumlah mRNA reseptor opioid κ antara gigi sensitif dan gigi tidak sensitif?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengkonfirmasi keberadaan reseptor opioid μ dan mengetahui ada tidaknya reseptor opioid δ , dan κ pada pulpa gigi manusia

2. Mengetahui perbedaan jumlah mRNA reseptor opioid μ antara gigi sensitif dan gigi tidak sensitif
3. Mengetahui perbedaan jumlah mRNA reseptor opioid δ antara gigi sensitif dan gigi tidak sensitif
4. Mengetahui perbedaan jumlah mRNA reseptor opioid κ antara gigi sensitif dan gigi tidak sensitif

D. Manfaat Penelitian

1. Bagi ilmu pengetahuan
Menambah khasanah ilmu pengetahuan dalam memahami modulasi nyeri di perifer yang berhubungan dengan peranan reseptor opioid terhadap sensitivitas gigi
2. Bagi profesi
Memberikan dasar pengetahuan tentang peranan reseptor opioid terhadap sensitivitas gigi sehingga lebih memahami adanya modulasi nyeri di perifer yang dapat menyebabkan terjadinya *painless* pulpitis
3. Bagi masyarakat
Memberikan informasi mengenai tingkat sensitivitas gigi yang berhubungan dengan banyaknya reseptor opioid pada gigi, sehingga dapat mencegah terjadinya *painless* pulpitis dengan lebih rutin memeriksakan kesehatan giginya ke dokter gigi

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Nyeri

Nosisepsi berasal dari Bahasa Latin “*nocere*” yang berarti menyakiti. Stimulus nosiseptif menyebabkan kerusakan jaringan dan mengaktifkan organ sensorik perifer yang disebut nosiseptor. Nosiseptor terletak pada ujung saraf yang berdiameter kecil, baik pada saraf yang bermielin (serabut A δ) maupun yang tidak bermielin (serabut C).¹⁶ Serabut saraf diaktivasi oleh stimulus mekanik, elektromagnetik, listrik, termal, dan kimia. Intensitas stimulus yang tinggi akan menyebabkan timbulnya rasa nyeri. Namun ada nyeri yang dapat timbul walaupun tidak ada stimulasi secara lokal (nyeri spontan), misalnya nyeri yang timbul sewaktu memegang kulit dengan lembut pada daerah artritis yang sedang mengalami inflamasi. Nyeri seperti ini disebut alodinia. Selain alodinia, ada juga hiperalgesia, yaitu nyeri yang timbul tidak sesuai dengan besarnya stimulus yang diberikan. Misalnya dengan stimulus rendah namun menghasilkan rasa nyeri yang tinggi.¹⁶

Mekanisme tubuh mengenal rasa nyeri terbagi menjadi 3 tahap, yaitu deteksi, prosesing, dan persepsi. Deteksi dilakukan oleh neuron sensorik perifer, prosesing melibatkan aktivasi susunan saraf pusat yang spesifik dan berhubungan dengan medula dan tanduk dorsal, sedangkan persepsi berhubungan dengan aktivasi bagian otak, seperti korteks serebri.² Mekanisme nyeri perifer hampir selalu berhubungan dengan kelainan odontogenik atau temporomandibular, dan kondisi orofasial lain yang mempunyai kemiripan dengan bagian tubuh lainnya. Kemiripan ini meliputi tipe saraf sensorik yang terlibat, reseptor, kanal ion, dan perjalanan sinyal intraselular yang bertanggung jawab terhadap transduksi, modulasi, dan perambatan stimulus perifer.¹⁷

Nyeri gigi merupakan pengalaman menyeluruh yang meliputi respon sensorik dan emosi serta mempengaruhi aspek konseptual dan motivasional.

Nyeri gigi merupakan tipe nyeri orofasial yang paling sering terjadi. Nyeri pulpa dan periapikal adalah alasan utama pasien pergi ke dokter gigi.³ Nyeri gigi timbul akibat stimulus fisik yang tajam maupun akibat pelepasan mediator inflamasi yang mentimulasi serabut saraf nosiseptif.

Stimulus yang mencederai pulpa dan dentin diklasifikasikan menjadi 4 tipe, yaitu² :

1. Tipe I

Stimulus tidak merusak pulpa dan dentin. Stimulus hanya mengakibatkan sedikit perubahan pada pulpa dan memengaruhi dentinogenesis, namun tidak digantikan oleh sel reparatif. Contoh stimulus pada tipe ini adalah preparasi kavitas dangkal, skeling dentin bagian servikal yang dangkal, dan gerakan ortodontik yang kuat.

2. Tipe II

Stimulus menimbulkan cedera dentin dengan kehilangan sebagian jaringan pulpa sehingga menimbulkan respon vaskular, namun pulpa dapat beregenerasi dan membentuk dentin reparatif. Terjadi pengeluaran neuropeptida SP dan CGRP dalam jumlah besar. Contoh stimulus pada tipe ini adalah kavitas dentin dalam, eksposur pulpa kecil, dan stimulasi panas dalam waktu lama atau berintensitas tinggi. Pada stimulasi ini, terjadi inflamasi aktif yang tidak diikuti dengan pembentukan jaringan parut.

3. Tipe III

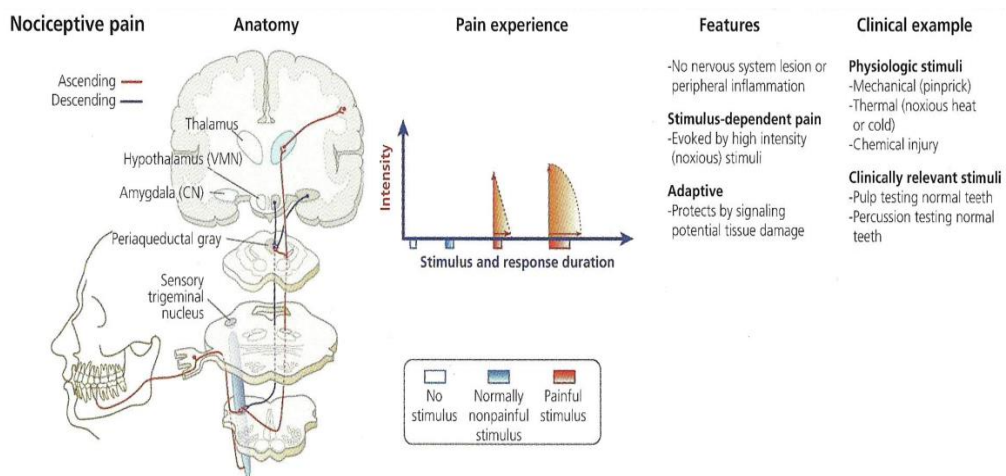
Stimulus pada tipe ini menimbulkan kerusakan pulpa dan infeksi yang tidak dapat diperbaiki (pulpitis ireversibel). Pulpa akan mengalami kerusakan progresif menuju keadaan nekrosis. Stimulus tipe ini dapat terjadi akibat eksposur pulpa akibat infeksi, kegagalan restorasi akibat invasi bakteri, kegagalan pulpa membentuk *scar barrier* di sekitar abses, dan kehancuran pulpa koronal akibat panas atau stimulus tinggi lainnya.

4. Tipe IV

Stimulus tipe ini mengenai jaringan lain, selain dentin dan pulpa. Hal ini ditemui pada infeksi pulpa yang meluas ke jaringan periradikular

yang melibatkan jaringan periodontal dan tulang. Ekstraksi gigi akan merusak ligamen periodontal dan pulpotomi menyebabkan reaksi saraf yang lama pada jaringan periradikular.

Stimulus akan mengaktifkan nosiseptor di perifer sehingga menimbulkan potensial generator yang cukup untuk membangkitkan potensial aksi impuls saraf. Potensial aksi akan berjalan menyusuri nervus trigeminalis di perifer menuju neuron aferen primer yang terletak pada ganglion trigeminalis menuju susunan saraf pusat. Nukleus trigeminal kaudalis sangat berperan penting pada modulasi dan transmisi informasi nosiseptif. Selanjutnya proses ini akan berlanjut ke medula, pons, dan talamus, dan dipersepsikan sebagai rasa nyeri oleh korteks serebri.¹⁸ Perjalanan nyeri ini dinamakan perjalanan nyeri ascending.



Gambar 1. Mekanisme nyeri nosiseptif. VMN adalah *ventromedial nucleus* dan CN adalah *central nucleus*²

Pada gambar 1 terlihat bahwa dalam perjalanan sinyal nyeri ke otak, terjadi modulasi nyeri oleh peptida opioid endogen dan sistem kanaboid endogen pada *periaqueductal gray* (PAG)-*rostral ventromedial medulla* (RVM).² Modulasi nyeri ini disebut sebagai perjalanan nyeri descending. Stimulasi berbagai populasi neural di PAG akan menyebabkan terjadinya peningkatan

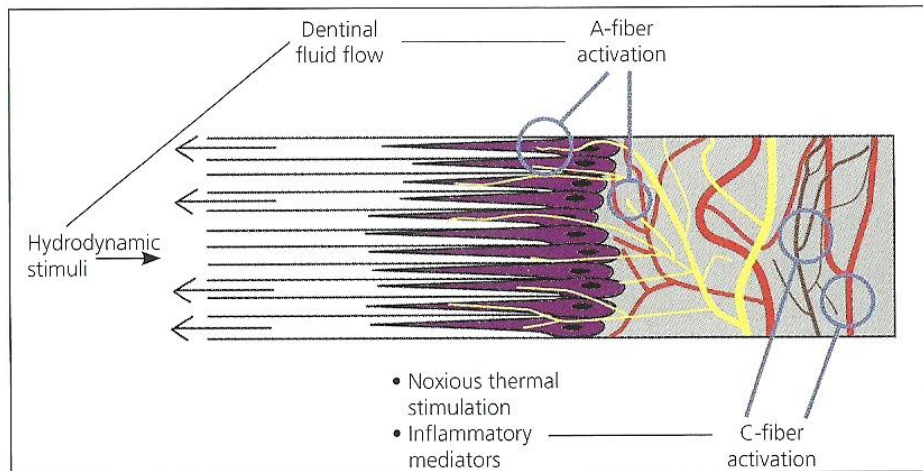
atau penghambatan neuron nosiseptif yang terletak pada tanduk dorsal maupun kaudal. Akibatnya otak akan mempersepsikan nyeri sebagai nyeri yang meningkat (hiperalgesia), menurun (analgesia), atau nyeri alih (*referred pain*).²

Selain pada susunan saraf pusat, ditemukan pula adanya modulasi nyeri di perifer. Telah ditemukan adanya reseptor opioid μ pada pulpa gigi molar manusia dan reseptor opioid μ , δ , dan κ pada berbagai jaringan di perifer, seperti paru-paru, ginjal, hati, jantung, timus, pankreas, dan kelenjar adrenal.^{13,14} Hal ini membuktikan adanya interaksi antara peptida opioid endogen dengan reseptor opioid yang dapat memodulasi nyeri pada perifer yang berperan penting mempengaruhi fungsi regulasi saraf pada susunan saraf pusat.¹⁴

B. Inervasi Pulpa

Pulpa merupakan jaringan yang penuh pembuluh darah dan saraf. Pulpa terdiri dari berbagai tipe sel, seperti odontoblas, fibroblas, sel inflamatori, sel vaskular, serta neuron sensorik dan simpatetik.⁴ Serabut saraf sensorik pulpa gigi ada pada ujung aferen nervus trigeminalis. Serabut saraf ini masuk melalui foramen apikal lalu bersama serat kolagen membentuk rangkaian neurovaskular. Ketika mencapai ruang pulpa, ujung saraf bercabang ke sekitar dentin membentuk pleksus Raschkow.³ Setelah itu, serabut yang bermielin melepaskan mielinnya menjadi ujung saraf bebas. Serabut ini banyak ditemukan di tanduk pulpa (sekitar 25% dari tubulus dentin), di mahkota dentin (15%), dan bagian akar (10%).¹⁹

Serabut saraf nosiseptor pada batas antara dentin dan pulpa diaktivasi oleh pergerakan cairan hidrodinamik sebagai respon atas stimulasi pada dentin (mekanisme hidrodinamik). Pada gambar 2 terlihat pergerakan cairan yang distimulasi oleh dentin yang terbuka.²



Gambar 2. Mekanisme aktivasi serabut saraf intradental. Serabut saraf pada batas dentin-pulpa merespon stimulus yang diinduksi oleh pergerakan cairan dalam tubuli dentin dan deformasi jaringan pulpa perifer yang mengandung ujung serabut saraf (mekanisme hidrodinamik)²

Serabut sensorik pada pulpa dibedakan berdasarkan diameter, kecepatan menghantarkan rangsang, dan fungsinya, yaitu serabut A dan serabut C. Serabut A memiliki akson yang bermielin sehingga dapat menghantarkan rangsang dengan cepat (sekitar 13 m/detik), memiliki ambang rangsang yang rendah, serta letaknya superfisial (pada pertemuan pulpa dan dentin) dan berakhir pada lapisan koronal odontoblas, predentin, dan *inner* dentin.² Serabut A yang memiliki diameter 1-4 μm merupakan serabut pertama yang bereaksi dan menghantarkan impuls nyeri meskipun tidak ada kerusakan jaringan yang bersifat ireversibel.¹ Serabut ini bereaksi terhadap rangsang mekanik seperti pengeburan, rangsang kimia, termal (dingin), serta rasa manis yang menyebabkan pergerakan cairan yang cepat dalam tubuli dentin. Hal ini akan menstimulasi ujung saraf mekanosensitif sehingga menghasilkan rasa sakit yang tajam dan menusuk. Serabut A yang terletak pada servikal dentin mempunyai respon yang lebih rendah terhadap stimulasi hidrodinamik dentin dibanding dengan serabut saraf yang terletak pada ujung mahkota gigi.²

Sembilan puluh persen serabut A adalah serabut $A\delta$.²⁰ Serabut ini berkumpul pada dentin dekat ujung tanduk pulpa, makin sedikit jumlahnya ke arah servikal, dan paling sedikit di dentin akar.² Serabut saraf $A\delta$ mempunyai

efek yang signifikan terhadap peredaran darah pulpa dan memiliki ambang rangsang yang bervariasi. Serabut saraf $A\delta$ dengan ambang rangsang rendah akan merespon stimulus getaran dan rasa dingin, sedangkan serabut saraf $A\delta$ dengan ambang rangsang tinggi akan merespon stimulus yang kuat, seperti instrumentasi mekanik, sehingga bertindak sebagai nosiseptor. Serabut $A\beta$ mempunyai akson terbesar dari semua tipe serabut A. Serabut ini berakhir dekat odontoblas sepanjang batas pulpa-dentin dekat ujung tanduk pulpa.² Serabut $A\beta$ lebih sensitif daripada serabut $A\delta$, bereaksi terhadap getaran, serta dapat distimulasi oleh getaran listrik tingkat rendah. Tujuh persen dari serabut saraf A pada pulpa premolar manusia adalah serabut $A\beta$.³

Serabut C tidak memiliki mielin pada aksonnya, kecepatan menghantarkan rangsang yang rendah, serta ambang rangsang yang tinggi. Letak serabut C lebih dalam dari serabut A dan dapat diaktifkan oleh panas dan menyebabkan rasa sakit yang tumpul, lambat, serta difus. Bila terjadi peningkatan intensitas nyeri, serabut C akan menghantarkan sensasi nyeri seperti terbakar dan dapat menjalar ke wajah dan rahang.²⁰ Reaksi serabut C menandakan bahwa kerusakan pulpa bersifat ireversibel.¹ Keberadaan serabut saraf C pada kumpulan saraf pada bagian tengah pulpa menjadi penyebab timbulnya *referred pain* akibat serabut saraf yang menginervasi beberapa pulpa. Serabut saraf C merangsang terbentuknya neurokinin, khususnya SP.³ Pulpa sebagian besar terdiri dari serabut C yang tidak bermielin dan sebagian kecil oleh serabut $A\delta$ yang bermielin.²

Inervasi pada pulpa akan seutuhnya selesai pada saat apeks gigi menutup sempurna.⁴ Penutupan apeks gigi premolar rahang bawah akan terjadi pada usia 12-13 tahun.²¹

C. Sensitivitas Gigi

Nyeri menjadi suatu masalah bila muncul tanpa penyebab, tidak proporsional dengan penyebabnya, atau tetap ada walau telah diberi pengobatan secara medik maupun non-medik. Dalam hal ini, nyeri kehilangan fungsinya dan menjadi sumber penderitaan. Biasanya nyeri muncul akibat

adanya penyakit atau trauma fisik, namun pada beberapa kondisi, variasi antar individu menyebabkan kondisi yang sama dirasakan berbeda oleh individu yang berbeda.²² Stimulus ringan dapat dirasakan sangat menyakitkan dan stimulus yang kuat tidak dirasakan sebagai sesuatu yang menyakitkan.²³

Penelitian pada otak menunjukkan bahwa penilaian subjektif terhadap nyeri sangat berhubungan dengan aktivitas neural pada berbagai bagian korteks dan subkorteks serebral yang terlibat dalam persepsi nyeri. Talamus, korteks somatosensorik primer dan sekunder, korteks anterior *cingulate*, korteks prefrontal, dan korteks insular terbukti meningkatkan aktivasi persepsi nyeri pada pemberian stimulus dengan berbagai intensitas. Pada penelitian menggunakan *visual analog scale*, individu yang menilai suatu stimulus sebagai rangsang yang sangat menyakitkan, mengaktifkan korteks somatosensorik primer, korteks anterior *cingulate*, dan korteks prefrontal lebih sering secara signifikan dibanding dengan individu yang menilai stimulus yang sama dengan rasa sakit sedang.²²

Gen juga terkait dengan sensitivitas nyeri, salah satunya adalah gen OPRM1 yang mengkode reseptor opioid μ . Semakin banyak gen OPRM1, maka ambang rangsang nyeri pada binatang percobaan akan semakin meningkat. Polimorfisme pada gen CYP2D6 menyebabkan individu yang terkait tidak mampu mengubah kodein menjadi morfin. Individu tidak mampu mendapatkan efek analgesik pada pemberian kodein.²³

Pengaruh gender terhadap sensitivitas nyeri telah menjadi topik luas di antara para peneliti nyeri selama 10 hingga 15 tahun terakhir. Wanita memiliki sensitivitas nyeri lebih tinggi dari pria pada berbagai tipe nyeri. Penelitian terhadap nyeri sendi temporomandibular menunjukkan bahwa wanita lebih tinggi prevalensinya dari pada pria pada usia rentang usia yang sama. Hasil penelitian serupa ditemukan pada nyeri gigi, sendi rahang, dan kondisi nyeri orofasial lainnya. Perbedaan gender terhadap nyeri orofasial terjadi pada usia 45-64 tahun namun tidak lebih dari 65 tahun. Terhadap nyeri yang distimulasi oleh listrik, ditemukan bahwa ambang batas dan toleransi wanita lebih rendah secara signifikan dibanding pria.²⁴

D. Neuropeptida Nosisseptif

Serabut saraf pulpa dapat mensekresi neuropeptida nosisseptif. Neuropeptida yang terletak pada akson pulpa manusia terdiri dari *tachykinin*, neurokinin A (NKA), SP, CGRP, VIP (*Vasoactive Intestinal Peptide*), dan neuropeptida Y (NPY), kolesistokinin, somatostatin, galanin, met dan leu-enkefalin. Eksitasi serabut A dan serabut C pada pulpa oleh stimulus dapat menghasilkan neuropeptida nosisseptif seperti substansi P (SP) dan *calcitonin gene-related peptide* (CGRP).⁴

Substansi P adalah mediator utama pada inflamasi neurogenik yang menyebabkan vasodilatasi dan kontraksi sel endotel sehingga terjadi ekstrasvasi plasma dan degranulasi mastosit. Granula mastosit akhirnya melepaskan histamin yang selanjutnya mengaktivasi nosisseptor. Limfosit, granulosit, dan makrofag mempunyai reseptor untuk SP dan sel-sel ini akan menstimulasi terbentuknya sitokin. Makrofag yang distimulasi SP akan memproduksi mediator inflamasi prostaglandin E₂, tromboksan, interleukin-1 (IL-1), IL-6, dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α . Semuanya ini akan menyebabkan sintesis dan pengeluaran SP yang baru. Reseptor SP juga ditemukan di jaringan pulpa manusia.³ Pada kasus ireversibel pulpitis kadar SP meningkat 8 kali lipat dibanding pulpa normal.²⁵

Calcitonin gene-related peptide dikenal sebagai vasodilator peptida yang ditemui hampir 50% pada neuron trigeminal. Peptida ini lebih berperan pada proses reparasi pulpa dan tidak berpengaruh besar terhadap perubahan inflamasi pulpa.⁵

Substansi P dan CGRP adalah faktor penyebab nyeri secara klinis yang ditemukan juga pada pulpa gigi. Keduanya merupakan neuropeptida yang menyebabkan terjadinya inflamasi neurogenik dan berperan dalam kontrol aliran darah, inflamasi, dan perbaikan jaringan.² Pada keadaan normal, konsentrasi SP dihasilkan 3,4 kali lebih besar daripada CGRP dan pada keadaan inflamasi, konsentrasi SP 22,3 kali lebih besar daripada CGRP.⁵

E. Peptida Opioid Endogen

Mekanisme kontrol nyeri yang berasal dari perifer berperan penting saat tubuh bereaksi atas adanya stimulus atau pada proses inflamasi dengan menghasilkan peptida opioid endogen, endokannabinoid, somatostatin, dan sitokin anti-inflamasi.⁹ Peptida opioid endogen ditemukan pada beberapa tingkatan sistem supresi nyeri sebagai bagian dari modulasi nyeri descending. Peptida opioid endogen muncul akibat pengaktifan PAG-RVM *pathway* dalam memodulasi transmisi nosiseptif pada salah satu komponen nukleus trigeminal kaudalis.² Peptida opioid endogen merupakan ligan natural yang berikatan dengan reseptor opioid untuk menghasilkan efek analgesik yang poten, baik dari susunan saraf pusat maupun perifer.¹²

Pada keadaan inflamasi, peptida opioid endogen akan dilepaskan oleh sel imun yang muncul saat mediator inflamasi bermigrasi ke jaringan inflamasi. Selanjutnya terjadi adhesi leukosit ke pembuluh darah yang dihubungkan oleh integrin. Setelah terjadi adhesi yang kuat, sel imun menembus endotelium dan bermigrasi ke daerah inflamasi lalu melepaskan peptida opioid yang selanjutnya akan berikatan dengan reseptor opioid perifer.¹² Tingkat inhibisi peptida opioid endogen proporsional dengan jumlah sel imun yang memproduksi peptida opioid endogen.²⁶ Ada 4 keluarga peptida opioid yang dihasilkan oleh tubuh, seperti berikut:

1. Endorfin

Endorfin diproduksi oleh kelenjar pituitari dan hipotalamus sewaktu sedang *exercise* serta dalam keadaan nyeri dan bersemangat. Saat berlatih, endorfin akan menyebabkan perasaan yang lebih baik. Endorfin merupakan penghilang nyeri alami bekerja seperti opioid dan banyak ditemui di otak dan sistem saraf. Dalam keadaan stres, endorfin akan bekerja sebaliknya, yaitu menurunkan ketegangan diri.²⁷ Endorfin dihasilkan oleh prepro-opiomelanokortin (pre-POMC) dan mempunyai afinitas tinggi terhadap reseptor opioid μ dan δ , serta afinitas rendah terhadap reseptor opioid κ .¹² Tipe endorfin yang diproduksi tubuh

adalah alfa (α), beta (β), gamma (γ), dan sigma (σ). β -endorfin adalah neurotransmitter peptida opioid endogen yang paling kuat dan bekerja di susunan saraf pusat maupun perifer. β -endorfin mempunyai afinitas tinggi terhadap reseptor opioid μ .²⁷

2. Enkefalin

Enkefalin yang berasal dari prepro-enkefalin terbagi menjadi met-enkefalin dan leu-enkefalin. Met-enkefalin ditemukan secara natural pada otak hewan dan manusia.²⁷ Leu-enkefalin memiliki afinitas tinggi terhadap reseptor δ daripada reseptor μ dan sedikit afinitas terhadap reseptor κ . Enkefalin dan endorfin memegang peranan penting dalam proses antinosiseptif bagi tubuh.¹²

3. Dinorfin

Dinorfin berasal dari prepro-dinorfin dan terbagi menjadi dinorfin A dan dinorfin B. Dinorfin bekerja pada reseptor κ dan memodulasi respon nyeri, menjaga homeostasis melalui kontrol nafsu makan, irama jantung, kontrol berat badan, dan regulasi suhu tubuh.²⁷

4. Endomorfina

Endomorfina terbagi menjadi endomorfina-1 dan endomorfina-2. Endomorfina mempunyai afinitas terhadap reseptor μ . Endomorfina-1 banyak ditemukan di otak, sementara endomorfina-2 pada korda spinalis. Endomorfina berperan penting dalam persepsi nyeri dan merespon stres.²⁷

Pada penelitian mengenai mRNA reseptor opioid pada otak dan berbagai jaringan perifer tubuh, ditemukan bahwa peptida opioid endogen di perifer mempunyai fungsi regulasi fisiologis yang sama pentingnya dengan regulasi neural pada susunan saraf pusat.¹⁴

F. Reseptor Opioid

Reseptor opioid perifer ada pada saraf sensorik, baik pada jaringan normal maupun pada jaringan inflamasi.¹⁰ Peptida opioid akan berikatan dan mengaktivasi reseptor opioid pada serabut saraf sensorik di perifer dan menimbulkan analgesia dengan menurunkan eksitasi serabut saraf sensorik dan menghambat pengeluaran neuropeptida proinflamasi.²⁶

Reseptor opioid disintesis pada *dorsal root ganglia* dan disalurkan melalui ujung serabut saraf aferen di sentral. Karakteristik reseptor opioid di perifer identik dengan yang ada di sentral.¹⁰ Reseptor opioid merupakan *G-protein-coupled receptor* yang mempunyai 7 domain trans-membran. Opioid endogen seperti endorfin dan opioid yang diberikan secara lokal akan mengaktifkan reseptor opioid di perifer melalui perlekatan pada G-protein yang menghambat produksi siklik AMP lalu berinteraksi dengan kanal K^+ , Ca^{2+} , dan kanal ion lainnya pada membran. Analgesia akan dihasilkan dari penurunan eksitasi nosiseptif, penurunan potensial aksi, dan mengurangi pengeluaran neuropeptida proinflamasi (SP dan CGRP) pada terminal saraf pusat dan perifer.²⁶ Ada tiga tipe reseptor opioid yang terdapat di sentral dan perifer untuk memodulasi nyeri, yaitu:

1. Reseptor opioid μ

Reseptor opioid μ merupakan reseptor yang paling poten.¹⁰ Ligan endogen untuk reseptor opioid μ adalah endorfin, endomorfina-1, dan endomorfina-2.²⁷ Ditemukan adanya interaksi antara reseptor opioid μ dan TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid receptor type 1*). *Transient receptor potential vanilloid receptor type 1* adalah reseptor kanal kalsium sensitif *capsaicin* yang berperan penting dalam hiperalgesia inflamatori.¹⁰ Reseptor opioid μ mempunyai afinitas tinggi terhadap morfin. Reseptor opioid μ terbagi menjadi μ_1 yang mempunyai afinitas terhadap morfin, menimbulkan analgesia supraspinal, dan dapat dihambat oleh nalokson dan μ_2 yang mempunyai afinitas rendah terhadap morfin, serta menyebabkan depresi pernafasan dan konstipasi.²⁷

2. Reseptor opioid κ

Agonis reseptor opioid κ berbeda dengan agonis reseptor opioid μ karena tidak menyebabkan depresi pernafasan atau konstipasi dan tingkat penyalahgunaannya rendah. Dinorfin (agonis endogen reseptor opioid κ) terbukti menyebabkan alodinia dan hiperalgesia pada tikus. Tipe reseptor opioid κ terbagi menjadi κ_1 yang bekerja pada spinal primer dan κ_3 yang bekerja pada supraspinal.²⁷

3. Reseptor opioid δ

Reseptor opioid δ mempunyai afinitas tinggi terhadap leu atau met-enkefalin sebagai ligan endogennya. Reseptor opioid δ menimbulkan analgesia lewat tanduk dorsal susunan saraf pusat. Naltrindol adalah antagonis selektif reseptor opioid δ .²⁷

Pada nyeri neuropatik terjadi kerusakan saraf mekanik yang menyebabkan perubahan ekspresi reseptor opioid pada susunan saraf perifer. Reseptor opioid μ , δ , dan κ menjadi tidak teratur dan ekspresi reseptor opioid μ menjadi *down-regulated*.¹²

Ketiga reseptor opioid ditemukan pada serabut saraf sensorik perifer dan dapat memodulasi fungsi saraf aferen dan eferen. Dengan *immunostaining* ditemukan reseptor opioid μ pada serabut saraf di ruang pulpa dan pada *nerve bundle* di radikular dan koronal pulpa molar manusia.¹³

Inflamasi dapat menyebabkan *up-regulate* reseptor opioid di perifer. Pada inflamasi tahap awal, inflamasi akan mengatasi hambatan perineural dan menyebabkan agonis dapat berikatan dengan reseptornya. Sementara itu, pada inflamasi tahap akhir terjadi peningkatan sintesis dan transport akson reseptor opioid di perifer.¹³

G. Metode Pemeriksaan Sensitivitas Pulpa

Alat test pulpa yang ideal harus meliputi kemudahan pada pemakaian alat, objektif, terstandarisasi, tidak menyebabkan nyeri, tidak membahayakan, akurat, dan terjangkau harganya. Fungsi penggunaan tes pada pulpa adalah

untuk menentukan kesehatan pulpa yang meragukan, mendiagnosis rasa nyeri, dan menegakkan diagnosis terhadap daerah radiolusen.²⁸ Sensitivitas pulpa dapat dites dengan menggunakan tes termal atau EPT (*electric pulp tester*) sehingga diketahui respon pulpa terhadap stimulus.²⁰

1. Tes termal

Tes termal dibagi menjadi 2 jenis, yaitu:

a. Tes panas

Dasar tes termal adalah pergerakan cairan dentin. Tes ini merangsang pulpa untuk mengeluarkan mediator yang mempengaruhi serabut saraf C.³ Tes panas dilakukan dengan menggunakan air panas (*hot water bath*) atau gutta-perca yang dihangatkan. Gutta-perca adalah media yang sering digunakan dalam tes panas. Metode ini akan menimbulkan nyeri yang lambat, yaitu 2 hingga 4 detik. Penggunaan metode ini harus hati-hati agar tidak merusak pulpa.²⁹

b. Tes dingin

Tes dingin menyebabkan kontraksi cairan berdasarkan hukum hidrodinamik sehingga menimbulkan respon yang kuat terhadap serabut saraf A. Penggunaan tes dingin secara berulang akan mengurangi respon nyeri pada pulpa untuk sesaat.³ Metode yang digunakan untuk tes dingin pada pulpa adalah stik es (0°C), stik CO₂ (-78°C), etilklorida (-5°C), dan diklorodifluorometan/DDM(-50°C).²⁹

2. *Electric pulp tester* (EPT)

Electric pulp tester adalah alat untuk memeriksa vitalitas pulpa yang secara luas digunakan dalam bidang endodontik. *Electric pulp tester* yang dioperasikan menggunakan baterai akan mengalirkan listrik ke permukaan gigi melalui *probe*. Listrik akan disalurkan pada tingkat yang rendah untuk mencegah stimulasi berlebihan dan menghindari ketidaknyamanan. Intensitas stimulus listrik ditingkatkan secara berkala hingga didapatkan hasil positif, yaitu saat pasien merasa tergelitik atau

tingling sensation yang terjadi akibat pergerakan ion pada tubuli dentin yang menyebabkan terjadinya depolarisasi serta potensial aksi terhadap serabut saraf A δ pada *dentinoenamel junction*. Hasil ini dapat dibaca secara digital pada layar kecil dan dicatat.³⁰



Gambar 3. *Electric Pulp Tester*

Agar EPT dapat berguna dengan baik, harus diperhatikan pemberian stimulus yang cukup, metode penggunaan yang tepat, dan interpretasi hasil yang akurat. Selain itu pengisolasian gigi sebelum tes juga sangat penting. Pengeringan email, penempatan strip plastik interproksimal, dan penggunaan *rubber dam* dan *cotton roll* akan mencegah penjarangan impuls listrik ke gigi sekitarnya.²⁰

Penggunaan medium perantara penting untuk menimbulkan impuls listrik yang baik ke gigi. Medium ini tidak boleh berbasis cairan karena akan menimbulkan hasil positif palsu bila terkena jaringan gingiva atau saliva. Gel lubrikasi K-Y, baking soda *Crest*, dan pemutih peroksida tartar memberikan konduksi listrik maksimum pada katoda. Dapat juga digunakan medium gel fluorida topikal sebagai medium.³¹ Konduksi medium yang baik sangatlah penting, terutama bila terjadi negatif palsu seperti kerusakan pada saluran akar atau trauma gigi.²⁰

Peletakan elektroda yang optimal merupakan hal penting yang perlu diperhatikan saat menggunakan EPT. Yang diharapkan terjadi adalah

dengan tingkat listrik serendah mungkin sudah membangkitkan respon. Peletakan elektroda yang optimal pada gigi anterior adalah pada sepertiga insisal, sedangkan pada gigi posterior adalah sepertiga bukal, di tengah antara tepi gingiva dan tepi oklusal gigi.

Electric pulp tester tidak dapat menstimulasi serabut saraf C karena serabut C membutuhkan rangsangan listrik yang lebih tinggi.³⁰ Penggunaan EPT pada gigi imatur akan memberikan hasil yang kurang realibel karena pada awal pembentukan gigi, pulpa mengandung serabut saraf C dalam jumlah besar, sedangkan serabut saraf A akan meningkat jumlahnya sejalan dengan usia hingga pembentukan apikal selesai.³ Berdasarkan penelitian yang dilakukan untuk mengetahui tingkat sensitivitas gigi, gigi dibagi menjadi gigi sensitif, yaitu angka yang tertera pada EPT lebih kecil atau sama dengan 20 dan gigi tidak sensitif, yaitu angka yang tertera pada EPT lebih dari 20.²³

Electric pulp tester banyak digunakan untuk membedakan berbagai lesi tanpa adanya radiograf dalam bidang endodontik. *Electric pulp tester* mengindikasikan transmisi saraf dan menunjukkan vitalitas pulpa, tapi tidak mengukur kesehatan pulpa. Gigi yang mengalami trauma dapat kehilangan fungsi sensoriknya untuk sementara sehingga tidak merespon EPT meskipun vaskularisasinya baik (negatif palsu), sedangkan gigi yang nekrosis sebagian dapat memberikan respon walau vaskularisasinya tidak baik (positif palsu).²⁹

Tingkat kesalahan penggunaan tes sensitivitas mencapai 10-16%. Hal-hal yang mempengaruhi tes sensitivitas antara lain ^{2,28} :

a. Kesehatan jaringan dan vitalitas saraf

Salah satu produk nekrotik perawatan saluran akar dapat menimbulkan listrik pada jaringan saraf di sekitarnya sehingga menimbulkan hasil positif palsu.

b. Objektivitas akibat sensasi yang tidak enak

Pada beberapa kasus yang melibatkan pasien muda, mereka ingin menghindari rasa tidak enak sehingga terjadi respon dini

c. Tingkat maturasi gigi

Gigi yang pertumbuhan apeksnya belum sempurna mempunyai ambang rangsang yang lebih tinggi sehingga dibutuhkan stimulasi tes sensitivitas yang lebih kuat dari gigi normal. Hal ini terjadi karena pertumbuhan gigi hingga berfungsi dengan baik terjadi lebih dahulu daripada pertumbuhan saraf. Pada kondisi ini tes dingin akan lebih realibel daripada EPT.

d. Trauma gigi

Gigi yang trauma tidak merespon EPT walaupun gigi masih vital dan pembuluh darah sudah mengalami revaskularisasi.

e. Gigi berakar ganda

f. Konsumsi obat-obatan

Penggunaan obat guanetidin dapat menurunkan 50% sensitivitas gigi. Selain itu, alkohol dan obat sedatif tidak merespon atau membutuhkan stimulasi yang lebih tinggi terhadap tes sensitivitas sehubungan dengan terjadinya peningkatan eksitasi saraf.

g. Usia

Pada pasien usia lanjut, tubuli dentin banyak yang menutup sehingga terjadi pengurangan respon terhadap tes termal, rongga pulpa juga menyempit akibat terjadi deposisi dentin, dan terjadi perubahan struktur dentin sekunder sehingga mengurangi pergerakan cairan pada tubulus dentin yang berakibat pada berkurangnya reaksi pasien terhadap tes dingin. Dengan bertambahnya usia terjadi peningkatan persentase gigi menjadi tidak sensitif terhadap stimulus termal dan penurunan jumlah serabut saraf aferen dan aposisi mineral yang mempengaruhi sensitivitas gigi terhadap panas maupun mekanisme hidrodinamik.

h. Penyakit periodontal

i. Alat ortodonti

Gigi yang pernah digerakkan oleh alat ortodonti menunjukkan adanya perubahan respirasi jaringan yang mempengaruhi berkurangnya aliran

darah dan memungkinkan terjadinya anoksia serabut A δ . Tekanan ortodonti akan meningkatkan batas respon terhadap EPT. Efek ini dapat terjadi selama 9 bulan setelah perawatan ortodonti.

j. Restorasi metal

Metal dapat menghasilkan konduksi pada jaringan periodonsium sehingga menimbulkan respon negatif palsu.

H. *Real-time Reverse Transcript-Polymerase Chain Reaction*

Analisis ekspresi gen adalah hal yang mendasar pada penelitian biologis dan dalam mendeteksi gen yang berbeda dari berbagai jaringan sehat maupun sakit untuk mendapatkan suatu hasil yang dapat menunjang peningkatan kualitas hidup manusia. Teknik *quantitative real-time RT-PCR* (Q-RT-PCR) digunakan untuk mengukur ekspresi gen yang memungkinkan didapatkannya tingkat ekspresi gen pada sel dan jaringan.³²

Penggunaan *Reverse Transcript* (RT) yang dilanjutkan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat mendeteksi dan mengkuantifikasi mRNA. *Reverse Transcript-Polymerase Chain Reaction* merupakan sebuah metode kuantitatif terpercaya untuk mendapatkan spesifitas, sensitivitas, dan reproduksi yang baik, yang tidak dimiliki oleh RT dan PCR, yaitu amplifikasi produk yang tidak spesifik, primers-dimers, efisiensi amplifikasi, formasi hetero-dupleks, dan sebagainya.³³ Penggunaan RT-PCR mempunyai berbagai keunggulan, di antaranya adalah mengurangi waktu analisis, sensitivitas analitik meningkat, tingkat reproduksi gen tinggi, dan mengurangi tingkat kontaminasi.³⁴ *Quantitative real time RT-PCR* dapat digunakan untuk mengobservasi perbedaan tingkat *copy* mRNA, bukan hanya perbandingan relatif dari kelipatannya saja. Tidak seperti perbedaan kelipatan yang harus dibandingkan setiap kali terhadap kontrol, *copy number* memungkinkan perbandingan sampel yang berbeda melalui pengujian terhadap distribusi mRNA dari berbagai jaringan. Dengan *quantitative real-time RT-PCR*, mRNA dapat dihitung secara absolut, tidak hanya dinormalisasi dengan standar internal (GAPDH) saja, namun juga terhadap kurva standar yang menyajikan perhitungan gen yang

tepat. Hal ini memungkinkan membandingkan level reseptor opioid pada jaringan yang berbeda karena semua sampel sudah dinormalisasi dengan standar yang identik. Selain itu, didapatkan pula profil reseptor yang lengkap dari jaringan yang diuji.¹⁴

Quantitative real-time RT-PCR yang berbasis *fluorescence* ini mampu mendeteksi dan mengukur asam nukleat dalam jumlah besar dari berbagai sampel sehingga sangat menunjang diagnosis molekular, sains, agrikultur, dan kedokteran. Dalam menunjang penelitian, *quantitative real-time RT-PCR* dapat digunakan untuk mengkuantifikasi mikroba, menentukan dosis gen, identifikasi transgen pada rekayasa makanan, dan forensik.³⁵

Marker yang perlu diperhatikan dalam penggunaan *real time RT-PCR* adalah:³³

1. Ekstraksi RNA

Integritas RNA murni sangat diperlukan dalam teknik analisis ekspresi gen. Persiapan total RNA murni adalah marker utama dalam kuantifikasi gen. *Real-time RT-PCR* memerlukan kualitas tinggi, bebas DNA, dan *ungraded RNA*. Diperlukan sampel RNA dengan kuantifikasi dan kualitas yang akurat untuk menormalisasikan mRNA terhadap RNA total. Long mRNA (hingga 10 kb) mudah didegradasi oleh *RNase* sewaktu pengumpulan jaringan, purifikasi, dan penyimpanan RNA. Enzim inhibitor jaringan dapat menurunkan efikasi reaksi RT dan PCR sehingga mengacaukan kuantifikasi hasil.

2. *Reverse transcription*

RNA akan diubah oleh *reverse transcript (RT)* menjadi *single-stranded (ss) complementary DNA copy (cDNA)*. Tahap ini merupakan tahap yang paling bervariasi dalam RT-PCR. Kontaminasi garam, alkohol, fenol, dan inhibitor yang terbawa dari proses isolasi RNA dapat mempengaruhi efikasi RT. Pemilihan primer untuk menginisiasi sintesis cDNA juga penting:

a. *Target gene-specific primers*

Primers ini bekerja baik dalam kenaikan temperatur reaksi RT dalam mengeliminasi transkrip yang tidak valid.

b. *Target gene-unspecific primers*

Banyak digunakan untuk mengatasi variasi pada RT dalam mensintesis cDNA. Contohnya: *random hexamer*, oktamer, atau primer dekamer

3. Deteksi kimia yang tepat

Metode untuk mendeteksi ampikon secara kuantitatif adalah dengan menggunakan:

a. *Gene-specific fluorescent probes* atau *specific double strand DNA binding agent* yang berbasis transfer energi resonansi *fluorescence*.

Probe yang lazim digunakan adalah ABI's TaqMan yang menggunakan aktivitas eksonukleatase 5'-3' TaqMan polimerase untuk mengkuantitatif sekuens target pada sampel. Hidrolisis probe akan memisahkan fluorofor dan *quencher* sehingga signal *fluorescence* akan meningkat.

b. *Non-sequence specific fluorescent intercalating dsDNA binding dye*

SYBR Green I (molecular probe) atau etidium bromida dapat bekerja maksimal dengan latar belakang yang tidak spesifik yang muncul pada putaran terakhir. Deteksi *SYBR Green I* menghasilkan hasil yang lebih akurat daripada TaqMan. SYBR Green melekat pada *double-stranded DNA* dan mengeluarkan cahaya pada fase eksitasi. Selaras dengan peningkatan produk PCR, terjadi peningkatan fluoresens secara proporsional terhadap DNA atau mRNA spesifik pada sampel yang diteliti. Pada saat fluoresens melewati fase eksponensial pada amplifikasi, akan didapatkan nilai *cycle threshold (Ct)*. Fluorofor *SYBR Green* bersifat tidak spesifik karena dapat menempel pada *double stranded DNA* lain pada PCR.³⁶

4. Kuantifikasi RT-PCR

a. Kuantifikasi absolut

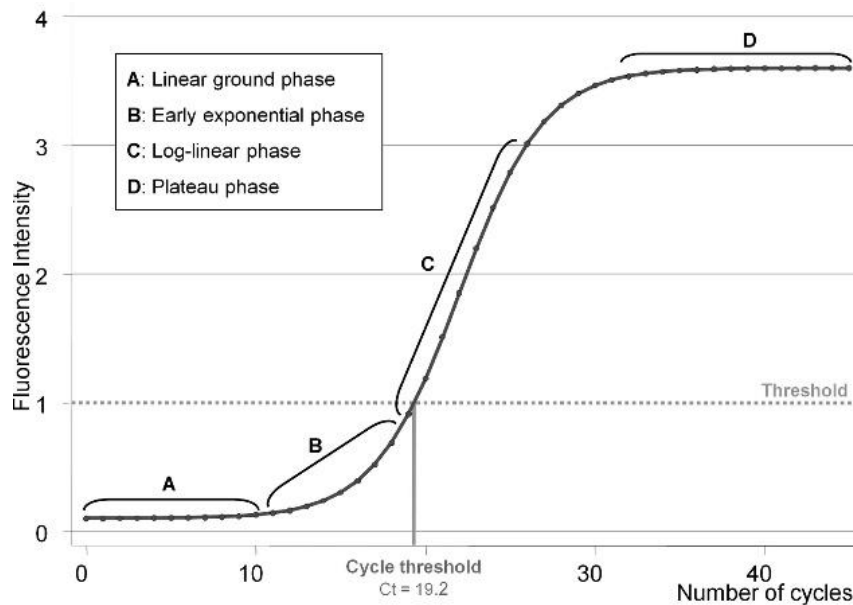
Kuantifikasi absolut menghubungkan signal PCR ke *input copy number* menggunakan standar.

b. Kuantifikasi relatif

Kuantifikasi ini lebih mudah dibanding kuantifikasi absolut karena menggunakan perubahan ekspresi mRNA terhadap *housekeeping gene* saja, tidak diperlukan kalibrasi kurva. Metode yang sering digunakan untuk kuantifikasi ekspresi gen mRNA secara relatif adalah metode $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.³⁷

5. Evaluasi data

Penghitungan unit dalam RT-PCR adalah *sample specific and characteristic crossing point (CP)*. Untuk menentukan CP dapat digunakan *Fit Point Method* dan *Threshold Cycle Method*.



Gambar 4. Kurva sigmoid hasil amplifikasi pada RT-PCR.³⁴

Hasil amplifikasi RT-PCR berupa kurva sigmoid yang terbagi menjadi 4 fase, yaitu fase linear dasar, fase awal eksponensial, fase linear log, dan fase plateau (Gambar 4).

Perbatasan antara level *threshold* dan kurva menunjukkan nilai *cycle threshold* (Ct). Nilai Ct dapat dikategorikan menjadi 5 tingkat dengan angka Ct yang berkisar antara 15 hingga 40 (Tabel 1).

Tabel 1. Kategori ekspresi mRNA dan skor berdasarkan nilai Ct.³⁸

Nilai Ct	Kategori ekspresi	Skor
15-20	sangat tinggi	5
>20-25	tinggi	4
>25-30	sedang	3
>30-35	rendah	2
>35-40	sangat rendah	1

Kemajuan perkembangan strategi kuantifikasi gen, *fluorescence*, dan instrumentasi mendukung mRNA dapat dikuantifikasi dengan tepat dalam waktu singkat. Untuk mendapatkan hasil yang akurat perlu meningkatkan sensitivitas, menurunkan tingkat variasi yang dapat terjadi, menurunkan resiko kontaminasi, meningkatkan proses secara otomatis, dan dapat menginterpretasikan data dengan tepat.³³

Untuk menghindari deviasi kuantifikasi, mRNA harus dinormalisasi terlebih dahulu untuk menghindari perbedaan kualitas dan kuantitas mRNA antar sampel akibat kesalahan pipet, perbedaan efikasi enzim yang digunakan pada *reverse-transcription* dan amplifikasi. Untuk menormalisasi sampel dapat digunakan gen *reference* atau *housekeeping gene* seperti, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), β -*actin*, β 2-*microglobulin*, *hypoxanthine phosphoribo-syl-transferase*, *porphobilinogen deaminase*, *phosphoglycerate kinase* (PGK), dan reseptor transferin.³⁴

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) adalah *housekeeping gene* yang paling sering digunakan untuk menormalisasi ekspresi gen secara kuantitatif. GAPDH sering digunakan sebagai internal kontrol pada berbagai sampel penelitian karena ekspresinya yang sangat konstan. GAPDH adalah enzim yang mengkatalisasi 6 tahap glikolisis. Tujuan pemakaian GAPDH adalah sebagai acuan agar ekspresi gen tetap konstan dalam sel atau jaringan yang diteliti.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

A. Kerangka Teori

Nyeri gigi merupakan pengalaman menyeluruh yang meliputi respon sensorik dan emosi serta mempengaruhi aspek konseptual dan motivasional. Nyeri gigi merupakan tipe nyeri orofasial yang paling sering terjadi. Nyeri pulpa dan periapikal adalah alasan utama pasien pergi ke dokter gigi.

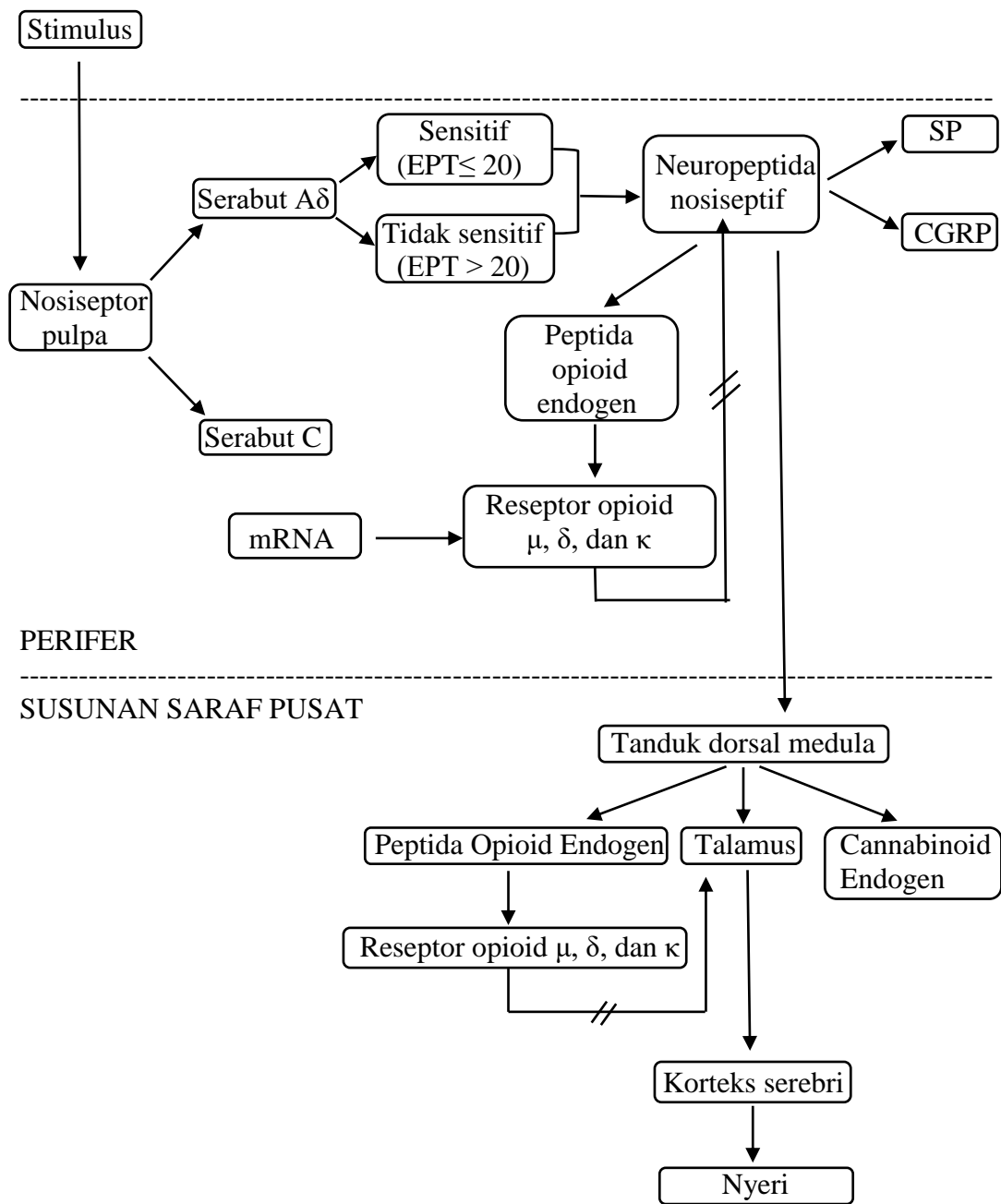
Pada pulpitis ireversibel asimtomatik, pulpa vital mengalami inflamasi namun tidak dapat sembuh dan memerlukan perawatan saluran akar. Keadaan ini tidak terdeteksi karena pasien sama sekali tidak merasakan nyeri sebelumnya. Diduga pasien mengalami *painless* pulpitis karena adanya efek analgesia akibat modulasi rangsang nyeri dari perifer sebelum mencapai korteks serebri.

Pulpa merupakan jaringan yang penuh dengan pembuluh darah dan saraf. Serabut saraf sensorik pulpa gigi ada pada ujung aferen nervus trigeminalis. Stimulus seperti mekanik, elektromagnetik, listrik, termal, dan kimia dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan mengaktifkan organ sensorik perifer yang disebut nosiseptor. Nosiseptor terletak pada ujung saraf yang berdiameter kecil, baik pada saraf yang bermielin (serabut A δ) maupun yang tidak bermielin (serabut C). Serabut A dan C dibedakan berdasarkan diameter, kecepatan menghantarkan rangsang, dan fungsinya. Stimulus akan mengakibatkan terjadinya pergerakan ion pada tubuli dentin yang menyebabkan terjadinya depolarisasi serta potensial aksi terhadap serabut saraf A δ pada *dentinoenamel junction*. Eksitasi serabut A δ dapat dites dengan menggunakan EPT sehingga dapat diketahui sensitivitas pulpa terhadap stimulus. Bila hasil EPT lebih kecil atau sama dengan 20, maka gigi dikategorikan sebagai gigi sensitif, sedangkan hasil EPT lebih dari 20 dikategorikan sebagai gigi tidak sensitif.

Selanjutnya, stimulus pada serabut saraf sensorik A dan C akan mengaktivasi pengeluaran neuropeptida nosiseptif seperti SP dan CGRP yang menjadi faktor penyebab timbulnya nyeri pada pulpa gigi dan inflamasi neurogenik. Potensial aksi akan menyalurkan signal ini ke tanduk dorsal medula yang terletak di susunan saraf pusat, yang selanjutnya akan diteruskan ke talamus dan dipersepsikan di otak sebagai rasa nyeri oleh korteks serebri.

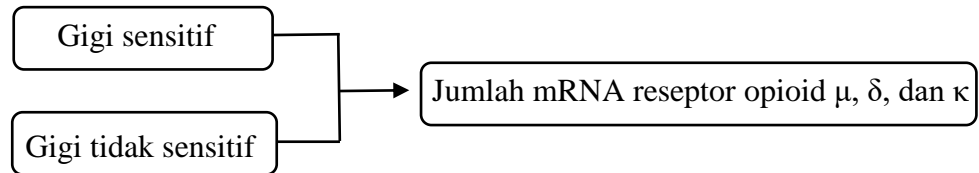
Dalam perjalanan signal nyeri ke otak, terjadi modulasi nyeri di sentral maupun perifer oleh peptida opioid endogen dan sistem kanaboid endogen. Peptida opioid endogen (endorfin, dinorfin, enkefalin, dan endomorfin) akan berikatan dan mengaktivasi reseptor opioid, seperti reseptor opioid μ , δ , dan κ di perifer dan sentral yang akan menimbulkan analgesia dengan menurunkan eksitasi serabut saraf sensorik dan menghambat pengeluaran neuropeptida proinflamasi. Telah ditemukan reseptor μ pada koronal dan apikal pulpa molar manusia, namun pada pulpa manusia belum ditemukan adanya reseptor opioid δ dan κ . Reseptor opioid δ baru ditemukan pada molar tikus. Akibat dari modulasi nyeri ini, terjadilah nyeri yang meningkat (hiperalgesia), menurun (analgesia), atau nyeri alih (*referred pain*).

Untuk mengkuantifikasi mRNA reseptor opioid μ , δ , dan κ dapat digunakan *quantitative real-time RT-PCR* yang berbasis *fluorescence* dan menggunakan GAPDH untuk menormalisasi ekspresi gen secara kuantitatif.



Gambar 5. Kerangka teori

B. Kerangka Konsep



C. Hipotesis

1. Ada reseptor opioid μ , δ , dan κ pada pulpa manusia
2. Ada perbedaan jumlah mRNA reseptor opioid μ antara gigi sensitif dan gigi tidak sensitif
3. Ada perbedaan jumlah mRNA reseptor opioid δ antara gigi sensitif dan gigi tidak sensitif
4. Ada perbedaan jumlah mRNA reseptor opioid κ antara gigi sensitif dan gigi tidak sensitif

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah:

1. Penelitian eksploratif untuk mengkonfirmasi adanya reseptor μ dan menemukan reseptor δ , dan κ pada pulpa gigi manusia
2. Penelitian observasional analitik untuk menguji perbedaan apabila ditemukan reseptor opioid μ , δ , dan κ dalam pulpa antara gigi sensitif dan gigi tidak sensitif dengan rancangan potong silang.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di klinik ortodontik swasta yang letaknya dekat dengan FKG Usakti dan penelitian dilakukan di Laboratorium *Biocore* FKG Usakti selama bulan September 2017 hingga Februari 2018.

C. Subjek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah pasien ortodonti usia 12-18 tahun memerlukan pencabutan dan bersedia menjadi subjek penelitian dengan menandatangani *informed consent*.

D. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah pulpa gigi premolar 1 bawah subjek penelitian. Besar sampel dihitung dengan rumus sebagai berikut ³⁹:

$$n = \left[\frac{(Z\alpha + Z\beta) \times 2Sd}{x_1 - x_2} \right]^2$$
$$Sd = \frac{(n_1 - 1) \times S_1^2 + (n_2 - 1) \times S_2^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}$$

- SD = standar deviasi perbedaan mean (ditentukan berdasarkan penelitian pendahuluan)
- n = jumlah sampel
- α = tingkat kemaknaan = 5%, maka $Z\alpha = 1,96$
- β = kekuatan uji = 80%, maka $Z\beta = 0,842$
- $x_1 - x_2$ = selisih mean antar kelompok

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan dan menggunakan rumus di atas, hasil $n=4$. Jadi besar sampel kelompok gigi sensitif adalah 4 gigi dan kelompok gigi tidak sensitif adalah 5 gigi.

E. Kriteria inklusi dan eksklusi

1. Kriteria inklusi
 - a. Gigi premolar 1 bawah (kiri atau kanan) sehat
 - b. Usia 12 -18 tahun
 - c. Kesehatan umum baik

2. Kriteria eksklusi
 - a. Pasien mengkonsumsi obat-obatan atau alkohol dalam waktu 1 minggu sebelum pencabutan gigi
 - b. Memiliki riwayat penyakit jantung dan diabetes
 - c. Premolar 1 bawah dengan apeks terbuka, karies, atrisi, erosi, ada kelainan anatomis, resesi gingiva, memakai mahkota selubung atau restorasi, ada peradangan pada jaringan penyangga gigi, sensitif atau memiliki riwayat trauma, memakai alat ortodontik lepasan atau cekat.
 - d. Terpasang braket pada gigi kaninus dan premolar 2 bawah yang mengapit gigi premolar 1 yang akan dicabut
 - e. Alergi anestesi lokal

F. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : sensitivitas gigi

2. Variabel tergantung : 1. mRNA reseptor opioid μ
 2. mRNA reseptor opioid δ
 3. mRNA reseptor opioid κ

G. Definisi Operasional Variabel

1. Sensitivitas gigi

Adalah sensasi menggelitik (*tingling sensation*) akibat stimulus listrik yang diberikan pada gigi dengan menggunakan alat EPT (*Digitest*, Parkell, USA). Nilai EPT didapat dengan menempelkan ujung EPT pada bagian bukal gigi yang akan dites. Pemakaian EPT dihentikan bila pasien merasakan *tingling sensation* yang pertama. Pasien dikatakan memiliki gigi sensitif bila angka sensitivitas yang ditunjukkan oleh EPT lebih kecil atau sama dengan 20 dan tidak sensitif bila angka yang ditunjukkan EPT lebih besar dari 20. Skala yang digunakan adalah skala nominal.

2. mRNA reseptor opioid μ

Adalah jumlah mRNA reseptor opioid μ yang dihitung secara kuantitatif pada jaringan pulpa segar premolar 1 bawah menggunakan Q-rt-RT-PCR. Skala yang digunakan adalah skala rasio.

3. mRNA reseptor opioid δ

Adalah jumlah mRNA reseptor opioid δ yang dihitung secara kuantitatif pada jaringan pulpa segar premolar 1 bawah menggunakan Q-rt-RT-PCR. Skala yang digunakan adalah skala rasio.

4. mRNA reseptor opioid κ

Adalah jumlah mRNA reseptor opioid κ yang dihitung secara kuantitatif pada jaringan pulpa segar premolar 1 bawah menggunakan Q-rt-RT-PCR. Skala yang digunakan adalah skala rasio.

H. Alat dan Bahan

Alat

1. *Autoclave* (Tomy, Japan)
2. *BioDrop* (Isogen Life Science, Netherlands)
3. *Biosafety Cabinet* (Nuair, Plymouth)
4. *Centrifuge* (Hermle, Germany)
5. *Cool box*
6. *Electric pulp tester* (Digitest, Parkell, USA)
7. Eskavator
8. *Fissure bur*
9. Gunting kecil
10. *Ice maker*
11. *Mallet dan chisel*
12. *Micropipette*
13. *96 well double sided 1.5 ml tube rack holder*
14. Oven (Mettler)
15. Pinset
16. Q-rt-RT-PCR (Qiagen, Germany)
17. *Spin down*
18. *Styrofoam*
19. *Super cold freezer -20°C* (Modena)
20. *Ultra low freezer -80°C* (Kaltis, Taiwan)
21. *Vortex V-1 Plus* (Biosan, Latvia)

Bahan

1. *Aluminium foil*
2. β -merkaptotanol
3. Es batu kecil
4. Masker
5. *Microcentrifuge tubes*

6. *Parafilm*
7. PBS (*phosphate buffer saline*)
8. Penutup kepala steril
9. *Pipette tips*
10. Primer dan probes untuk MOR, DOR, KOR, dan GAPDH (*GeneCraft*)
11. Pulpa gigi segar premolar 1
12. *RNease Mini Kit* (Qiagen, German)
13. Sarung tangan steril
14. *Thermafreeze*
15. Tube 1.5 ml
16. *QuantiNova SYBR Green RT-PCR kit* (Qiagen, German)

I. Cara kerja

Sebelum penelitian dimulai, dilakukan pengajuan *ethical clearance* pada Komisi Etik Penelitian FKG Usakti

Tahap I : Penentuan sensitivitas gigi

1. Pasien mengisi *informed consent*
2. Siapkan tube 1.5 ml yang berisi larutan β -merkaptotanol dan buffer RLT (10 μ l β -merkaptotanol : 1 ml buffer RLT)
3. Isolasi premolar 1 yang akan diekstraksi dengan kapas gulung dan keringkan.
4. Pasta gigi dioleskan pada 1/3 bukal gigi premolar 1 lalu dilakukan pengukuran dengan EPT.
5. Tingkatkan kenaikan arus EPT angka 0 hingga 64 (maksimum).
6. Pasien diinstruksikan untuk mengangkat tangan jika merasakan sensasi menggelitik (*tingling sensation*) untuk pertama kalinya
7. Catat angka pada EPT yang merupakan sensasi awal yang dirasakan pasien.
8. Gigi diberi stimulus dengan EPT sebanyak 3 kali dengan interval 1 menit

9. Dilakukan pencabutan gigi lalu gigi dicuci dengan air (bila tidak memungkinkan untuk dilakukan pengambilan pulpa di klinik, gigi direndam dalam tube berisi cairan PBS, dibungkus dengan *thermafreeze* lalu dimasukkan dalam *cool-box*. Ekstraksi pulpa dapat dilakukan di tempat lain dengan segera)
10. Bagian buko-lingual gigi dibur dengan *fissure bur* steril, lalu gigi dibelah menggunakan *mallet* dan *chisel*
11. Pulpa diambil menggunakan pinset lalu digunting kecil-kecil
12. Masukkan potongan pulpa pada tube 1.5 ml yang berisi larutan β -merkaptoetanol dan buffer RLT
13. Tube 1.5 ml dibungkus dengan *thermafreeze* lalu dimasukkan dalam *cool-box*
14. Pulpa ditransportasikan ke *Biocore* FKG Usakti untuk disimpan pada *freezer* -80°C

Tahap II : Ekstraksi RNA

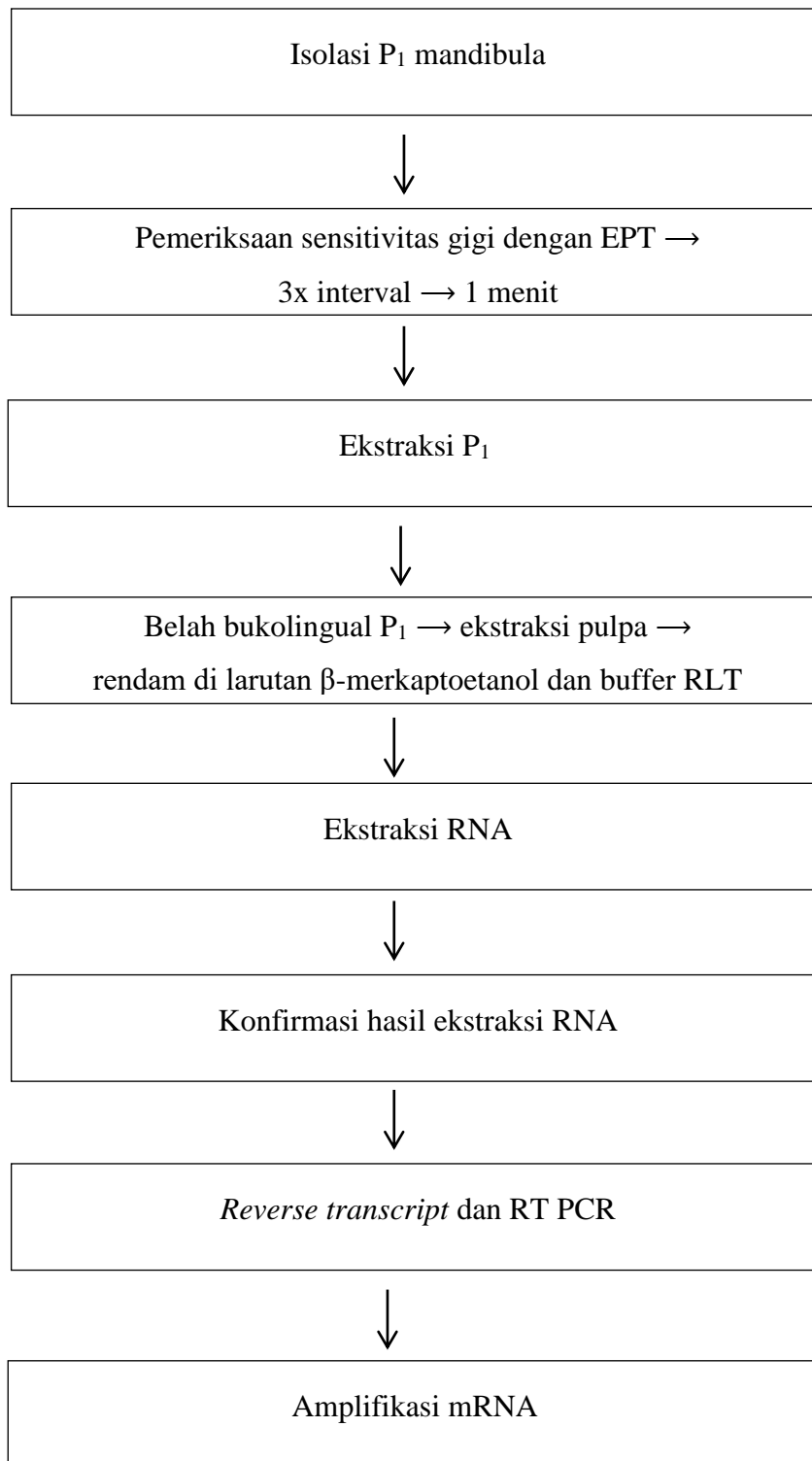
1. Sampel dikeluarkan dari *freezer* untuk diekstraksi RNA lalu *tube* di *thawing* hingga sampel mencair
2. Dilakukan *disruption* pada pulpa pada *biosafety cabinet* :
 - a) *Vorteks* dan *spindown* tube berisi pulpa
 - b) Pindahkan supernatant pada tube 1.5 ml baru
 - c) Tumbuk pellet dengan tips *micropipette* kecil hingga halus
 - d) Masukkan sedikit cairan supernatant pada tube pellet
 - e) Pindahkan pellet dan cairan ke tube supernatant
3. Dilakukan ekstraksi RNA menggunakan *RNeasy Mini Kit* dengan dilusi sebanyak 2x
4. Hasil ekstraksi RNA dicek konsentrasinya dengan menggunakan *BioDrop*

Tahap III : Pengukuran mRNA reseptor opioid

1. Dilakukan persamaan konsentrasi untuk semua sampel dengan cara mengikuti konsentrasi terkecil dari sampel yang ada, yaitu 6.5. Sampel lain yang lebih tinggi konsentrasinya diberi *Rneasy free water* menggunakan rumus $M1.V1 = M2.V2$. (M1 adalah konsentrasi sampel awal dan V1 adalah volume sampel yang harus diambil dari *tube* pertama, sedangkan M2 adalah konsentrasi sampel yang diinginkan, yaitu 6.5, dan V2 adalah volume sampel ditambah volume *Rnase free water*).
2. Pembuatan master mix SYBR Green dengan primers sebagai berikut:

MOR:	<i>Forward</i>	: TACCGTGTGCTATGGACTGA
	<i>Reverse</i>	: ATGATGACGTAAATGTGAAT
DOR:	<i>Forward</i>	: GCGGGAAAGCCAGTGACTC
	<i>Reverse</i>	: TGCCCTGTTTAAGGACTCAGTTG
KOR:	<i>Forward</i>	: CGTCTGCTACACCCTGATGATC
	<i>Reverse</i>	: CTCTCGGGAGCCAGAAAGG
GAPDH:	<i>Forward</i>	: GGAAGCTCACTGGCATGGC
	<i>Reverse</i>	: TAGACGGCAGGTCAGGTCCA

3. Identifikasi mRNA reseptor opioid dikerjakan secara duplo dengan menggunakan sampel sebanyak 1 μ L untuk tiap *tube* yang akan diperiksa.
4. Dilakukan *reverse transcript* dan *real time* PCR untuk mengukur jumlah mRNA GAPDH, MOR, DOR, dan KOR
5. Dilakukan amplifikasi



Gambar 6. Alur penelitian

J. Analisis Data

1. Dilakukan uji normalitas. Jika distribusi data normal, maka data diuji dengan uji statistik parametrik. Bila distribusi data tidak normal, maka data diuji dengan uji statistik non-parametrik
2. Uji parametrik menggunakan uji-t, sedangkan uji non-parametrik menggunakan uji Mann-Whitney antara jumlah mRNA reseptor opioid μ , δ , dan κ pada gigi sensitif dan gigi tidak sensitif.

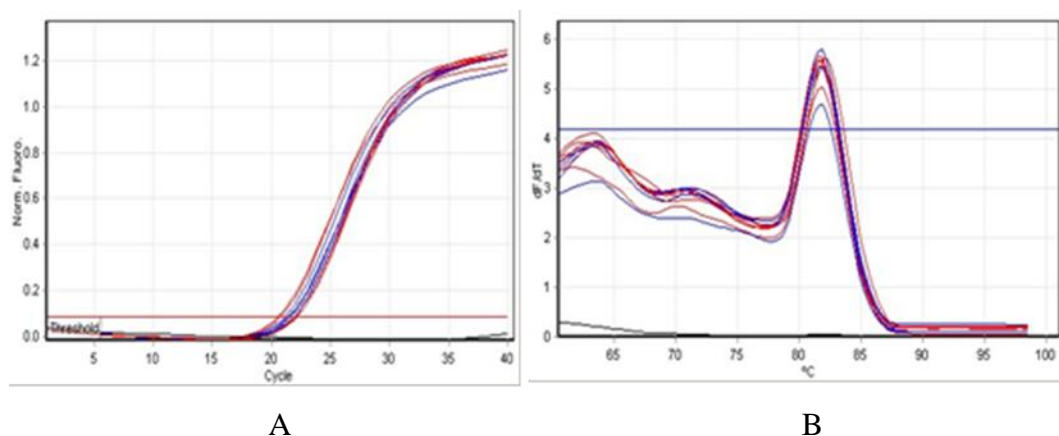
BAB V

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengkonfirmasi keberadaan reseptor opioid μ dan mengidentifikasi keberadaan reseptor δ , dan κ . Sampel yang digunakan berjumlah 9 gigi premolar satu bawah yang terdiri 4 gigi premolar satu bawah kiri dan 5 gigi premolar satu bawah kanan. Melalui pemeriksaan sensitivitas gigi menggunakan EPT didapatkan 5 gigi tidak sensitif ($EPT > 20$) dan 4 gigi sensitif ($EPT \leq 20$). Pulpa yang sudah diekstraksi RNA-nya diperiksa konsentrasinya dengan menggunakan *Biodrop*, lalu dilakukan pengenceran dengan menggunakan *RNase free water* untuk mendapatkan konsentrasi mRNA yang sama untuk tiap sampel. Pengenceran dilakukan mengikuti konsentrasi terkecil dari sampel yang ada, yaitu $6,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$, artinya dalam tiap mikroliter terdapat 6,5 nanogram sampel. Sampel yang dipakai pada RT-PCR adalah sebanyak 1 mikroliter tiap tube.

A. Deskripsi Data

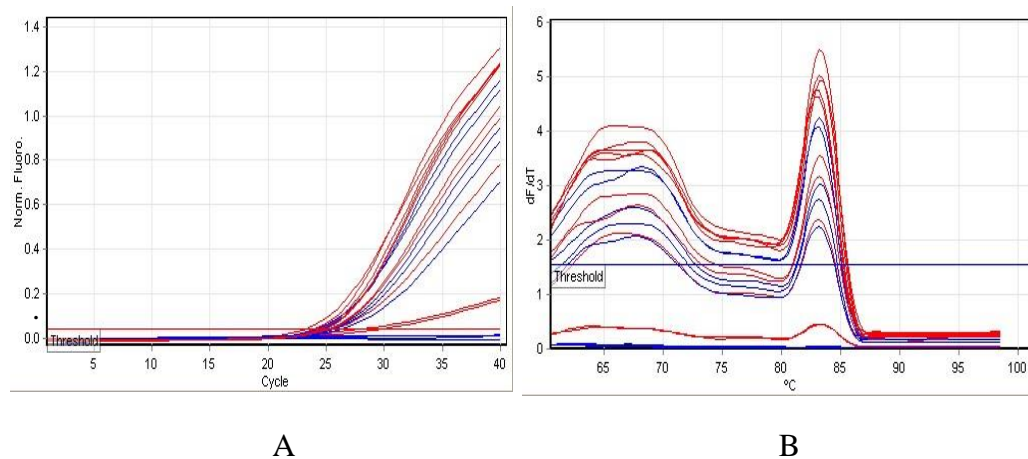
Hasil amplifikasi RNA menggunakan RT-PCR dengan *SYBR Green* dan GAPDH sebagai *housekeeping gene* sebanyak 40 *cycle*.



Gambar 7. Hasil amplifikasi GAPDH sebagai *housekeeping gene* (A) dan *melting curve* GAPDH (B)

Pada gambar 7 terlihat adanya ekspresi mRNA reseptor opioid μ (MOR), κ (KOR), dan δ (DOR) pada pulpa gigi semua sampel. GAPDH yang diukur pada RT-PCR dengan suhu *annealing* 55⁰ C teramplifikasi pada semua sampel dan *melting curve* terletak pada regio yang sama.

Amplifikasi mRNA MOR dilakukan dengan suhu *annealing* 47⁰ C dan didapatkan *melting curve* pada regio yang sama pada semua sampel (Gambar 8).



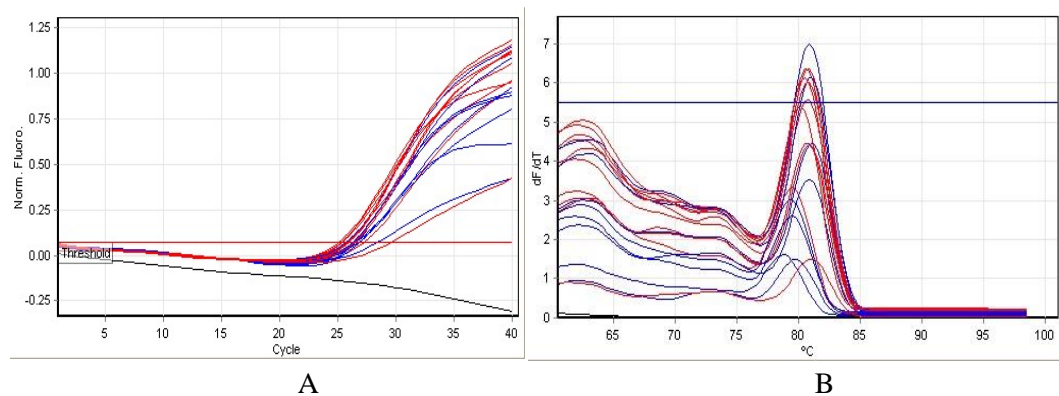
Gambar 8. Hasil amplifikasi mRNA MOR (A) dan *melting curve* mRNA MOR (B)

Analisis jumlah ekspresi mRNA MOR gigi sensitif menggunakan metode $\Delta\Delta Ct$ dibanding dengan gigi tidak sensitif.³⁷ Nilai ΔCt MOR didapatkan dengan mengurangi nilai Ct GAPDH dari nilai Ct MOR. Pada penelitian ini, gigi tidak sensitif dijadikan pembanding (*calibrator sample*) bagi sampel kelompok sensitif sehingga akan diketahui berapa kali peningkatan atau penurunan jumlah mRNA gigi sensitif terhadap gigi tidak sensitif. Jadi, nilai $\Delta\Delta Ct$ MOR gigi tidak sensitif adalah 0 dan nilai $\Delta\Delta Ct$ MOR gigi sensitif merupakan hasil pengurangan ΔCt MOR gigi sensitif terhadap gigi tidak sensitif. Dari hasil $2^{-\Delta\Delta Ct}$ terlihat bahwa jumlah ekspresi mRNA MOR gigi sensitif mengalami *downregulated*, yaitu sebanyak 0,95 kali terhadap jumlah ekspresi mRNA MOR gigi tidak sensitif (Tabel 2).

Tabel 2. Kuantifikasi relatif mRNA MOR pada gigi sensitif dan gigi tidak sensitif menggunakan metode $\Delta\Delta Ct^{37}$

KELOMPOK	Nomor sampel	Nilai EPT	Ct MOR	Ct MORd	Rerata Ct MOR	Ct GAPDH	ΔCt MOR	Rerata ΔCt MOR	$\Delta\Delta Ct$ MOR $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
TIDAK SENSITIF	1	24,60	28,30	29,77	29,04	20,66	8,38		
	2	64,00	23,33	25,67	24,50	20,86	3,64		
	3	43,00	24,12	25,34	24,73	21,92	2,81	4,05 ± 2,45	0,00
	4	41,00	24,88	24,54	24,71	22,22	2,49		
	5	42,00	24,88	25,33	25,11	22,15	2,96		
SENSITIF	6	14,30	24,76	25,54	25,15	21,93	3,22		
	7	7,60	26,00	25,41	25,71	21,23	4,48	4,12 ± 0,60	0,07
	8	12,30	27,03	24,94	25,99	21,53	4,46		
	9	19,00	26,23	25,75	25,99	21,65	4,34		

Amplifikasi mRNA KOR dilakukan dengan suhu *annealing* 52⁰ C dan didapatkan *melting curve* pada regio yang sama pada semua sampel (Gambar 9). Pada tabel 3 terlihat bahwa jumlah ekspresi mRNA KOR gigi sensitif mengalami *downregulated*, yaitu sebanyak 0,77 kali terhadap jumlah ekspresi mRNA KOR gigi tidak sensitif.

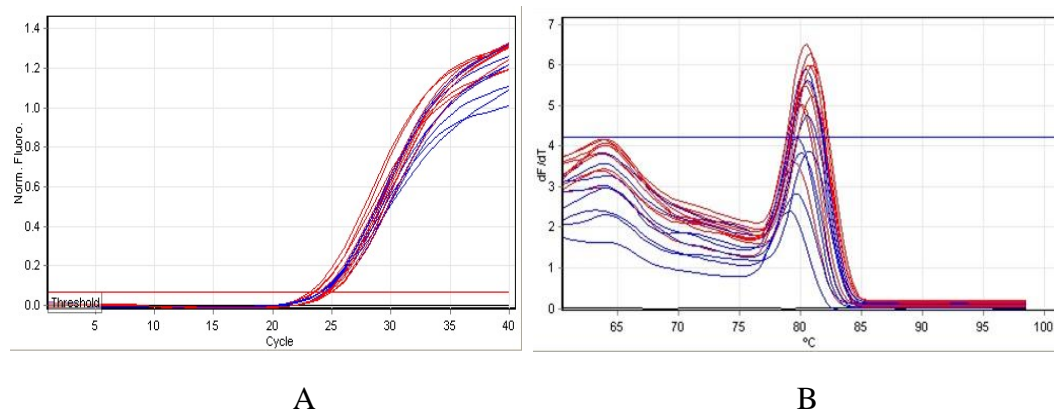


Gambar 9. Hasil amplifikasi mRNA KOR (A) dan *melting curve* mRNA KOR (B)

Tabel 3. Kuantifikasi relatif mRNA KOR pada gigi sensitif dan gigi tidak sensitif menggunakan metode $\Delta\Delta Ct$

KELOMPOK	Nomor sampel	Nilai EPT	Ct KOR	Ct KORd	Rerata Ct KOR	Ct GAPDH	ΔCt KOR	Rerata ΔCt KOR	$\Delta\Delta Ct$ KOR	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
TIDAK SENSITIF	1	24,60	25,28	25,63	25,46	20,66	4,80			
	2	64,00	25,10	25,35	25,23	20,86	4,37			
	3	43,00	26,33	27,25	26,79	21,92	4,87	$4,71 \pm 0,77$	0,00	1,00
	4	41,00	25,85	25,98	25,92	22,22	3,70			
	5	42,00	26,43	29,47	27,95	22,15	5,80			
SENSITIF	6	14,30	26,35	26,80	26,58	21,93	4,65			
	7	7,60	28,34	26,88	27,61	21,23	6,38	$5,09 \pm 0,87$	0,38	0,77
	8	12,30	26,47	26,25	26,36	21,53	4,83			
	9	19,00	25,71	26,56	26,14	21,65	4,49			

Amplifikasi mRNA DOR dilakukan dengan suhu *annealing* 52^0 C dan didapatkan *melting curve* pada regio yang sama pada semua sampel (Gambar 10). Pada tabel 4 terlihat bahwa jumlah ekspresi mRNA DOR gigi sensitif mengalami *downregulated*, yaitu sebanyak 0,97 kali terhadap jumlah ekspresi mRNA DOR gigi tidak sensitif.



Gambar 10. Hasil amplifikasim mRNA DOR (A) dan *melting curve* mRNA DOR (B)

Tabel 4. Kuantifikasi relatif mRNA DOR pada gigi sensitif dan gigi tidak sensitif menggunakan metode $\Delta\Delta Ct$

KELOMPOK	No sampel	Nilai EPT	Ct DOR	Ct DORd	Rerata Ct DOR	Ct GAPDH	ΔCt DOR	Rerata ΔCt DOR	$\Delta\Delta Ct$ DOR	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
TIDAK SENSITIF	1	24,60	23,40	23,14	23,27	20,66	2,61			
	2	64,00	23,99	23,60	23,80	20,86	2,94			
	3	43,00	24,97	24,72	24,85	21,92	2,93	$2,73 \pm 0,26$	0,00	1,00
	4	41,00	24,59	24,49	24,54	22,22	2,32			
	5	42,00	24,99	25,02	25,01	22,15	2,86			
SENSITIF	6	14,30	24,98	25,02	25,00	21,93	3,07			
	7	7,60	24,06	24,05	24,06	21,23	2,83	$2,77 \pm 0,23$	0,04	0,97
	8	12,30	24,08	24,07	24,08	21,53	2,55			
	9	19,00	24,15	24,41	24,28	21,65	2,63			

Dilihat dari rerata nilai Ct, ekspresi mRNA MOR dan KOR termasuk dalam kategori sedang, sedangkan ekspresi mRNA DOR termasuk dalam kategori tinggi (Tabel 5).³⁸

Tabel 5. Kategori ekspresi mRNA MOR, KOR, dan DOR berdasarkan nilai rerata Ct

Reseptor opioid	Rerata Ct	Kategori ekspresi	Nilai ekspresi
MOR	$25,66 \pm 1,382$	sedang	3
KOR	$26,45 \pm 0,909$	sedang	3
DOR	$24,32 \pm 0,588$	tinggi	4

B. Analisis statistik

Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan uji Saphiro-Wilk dan didapatkan nilai $p > 0,05$ pada semua kelompok, artinya semua data terdistribusi normal (Lampiran 4). Oleh karena sampel terdistribusi normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji t.

Hasil uji t antara kelompok gigi sensitif dan kelompok gigi tidak sensitif menunjukkan bahwa:

1. Tidak ada perbedaan jumlah mRNA MOR gigi tidak sensitif dengan jumlah mRNA MOR gigi sensitif ($p > 0,05$)

2. Tidak ada perbedaan jumlah mRNA KOR gigi tidak sensitif dengan jumlah mRNA KOR gigi sensitif ($p > 0,05$)
3. Tidak ada perbedaan jumlah mRNA DOR gigi tidak sensitif dengan jumlah mRNA DOR gigi sensitif ($p > 0,05$)

BAB VI PEMBAHASAN

Reseptor opioid merupakan *rhodopsin-like* reseptor yang termasuk dalam subfamili *G-protein-coupled reseptor* (GPCR) yang disintesis oleh *dorsal root ganglion* menuju serabut saraf aferen ke sentral dan perifer.¹² Ada tiga tipe reseptor opioid yang terdapat di SSP dan di perifer, yaitu reseptor opioid μ (MOR), κ (KOR), dan δ (DOR). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui mengkonfirmasi keberadaan MOR dan mengidentifikasi keberadaan KOR, dan DOR pada pulpa manusia yang berasal dari gigi sensitif dan tidak sensitif. Perbedaan sensitivitas antar pasien merupakan sebuah fenomena yang patut diwaspadai. Ada pasien yang dengan karies kecil sudah merasa nyeri, sedangkan pasien lain tidak merasakan nyeri walau pulpa dalam keadaan vital namun mengalami inflamasi yang memerlukan perawatan saluran akar. Fenomena *painless pulpitis* ini memerlukan kajian lebih jauh berkaitan dengan keterlambatan perawatan yang berakibat pada kehilangan gigi. Perbedaan sensitivitas gigi ini juga kerap menimbulkan masalah bagi dokter gigi dalam menegakkan diagnosis dan membuat rencana perawatan. MOR, KOR, dan DOR diduga berperan dalam modulasi nyeri di perifer sebagai penyebab terjadinya *painless pulpitis*.

Eksistensi MOR pada pulpa manusia telah berhasil dibuktikan dengan menggunakan teknik imunohistokimia, namun belum diketahui apakah reseptor opioid lainnya, KOR dan DOR, juga terdapat pada pulpa gigi manusia.¹³ Pada penelitian ini, amplifikasi mRNA pulpa gigi premolar satu bawah dengan menggunakan RT-PCR, berhasil mengkonfirmasi adanya MOR dan membuktikan keberadaan KOR dan DOR untuk pertama kalinya. Hal ini menunjukkan adanya reseptor opioid pada susunan saraf perifer yang dapat berinteraksi dengan opioid endogen maupun eksogen dan memungkinkan terjadinya efek modulasi nyeri sebelum menuju susunan saraf pusat. Opioid endogen atau eksogen akan mengaktivasi reseptor opioid melalui ikatan dengan *inhibitory* G-protein lalu menurunkan kadar *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) dan menghambat influx Ca^{++} atau Na^+ . Hal ini mengakibatkan terjadinya hiperpolaritas membran

saraf yang menurunkan pengeluaran SP, CGRP, serta mediator inflamasi lainnya dan menimbulkan analgesia.¹²

Opioid endogen merupakan peptida opioid yang merupakan ligan untuk berbagai tipe reseptor opioid. Ada 3 keluarga besar peptida opioid endogen yang sudah berhasil diidentifikasi, yaitu endorfin, dinorfin, dan enkefalin. Beta endorfin yang memiliki afinitas tinggi terhadap MOR merupakan opioid endogen yang sangat kuat untuk meredam nyeri. Dinorfin yang bertindak sebagai modulator dalam respon terhadap nyeri, terutama nyeri spinal dan supraspinal, memiliki afinitas tinggi terhadap KOR. Sedangkan, endorfin dan enkefalin (met/leu enkefalin) yang memiliki peran penting sebagai antinosiseptif endogen memiliki afinitas tinggi terhadap DOR, terutama di SSP.²⁷ DOR bersifat neuroproteksi terhadap keadaan hipoksia atau iskemik.⁴⁰

Reseptor opioid di perifer teridentifikasi pada serabut saraf sensorik, baik pada jaringan normal, maupun pada jaringan inflamasi. Meskipun demikian, agonis opioid perifer akan menghasilkan analgesia dengan lebih signifikan pada keadaan inflamasi dan tidak signifikan pada keadaan normal. Terjadinya analgesia dipicu dengan adanya inflamasi.¹⁰ Penelitian ini menggunakan pulpa gigi sehat sebagai dasar untuk mengetahui sebaran MOR, KOR, dan DOR pada pulpa gigi yang belum pernah diteliti sebelumnya. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai sebaran MOR, KOR, dan DOR pada keadaan inflamasi karena efek antinosiseptif opioid yang diperantarai reseptor opioid di perifer akan muncul saat terjadi inflamasi. Pada awal terjadinya inflamasi, transkripsi reseptor opioid pada *dorsal root ganglion* belum meningkat, walau peptida opioid endogen yang berasal dari lekosit seperti β -endorfin, met-enkefalin, dan dinorfin A sudah mulai mengaktivasi MOR, KOR, DOR di perifer untuk menghambat nosisepsi. Namun pada inflamasi tahap lanjut, jumlah reseptor opioid perifer mengalami *upregulation* sehingga dapat meningkatkan efikasi opioid. Selain itu, β -endorfin yang mengaktivasi MOR dan DOR mulai memproduksi efek antinosiseptif secara eksklusif. Hal ini membuktikan bahwa mekanisme penghambat nyeri di perifer memegang peranan penting dalam modulasi nyeri dan modulasi nyeri semakin besar efeknya sejalan dengan waktu dan makin bertambahnya tingkat inflamasi.²⁶

Hasil uji beda pada ekspresi mRNA MOR, KOR, dan DOR menyatakan tidak ada perbedaan jumlah mRNA antara gigi tidak sensitif dengan gigi sensitif. Hal ini berarti jumlah reseptor opioid tidak berpengaruh terhadap sensitivitas gigi. Penelitian tentang MOR dan KOR di perifer pada hewan coba menunjukkan bahwa MOR dan KOR berinteraksi dengan serabut saraf aferen primer dalam menghambat transmisi nosiseptif oleh serabut C.¹⁰ Jika tempat melekat (*binding site*) MOR terdapat pada serabut C dan bukan pada serabut A δ , maka dapat dimengerti bahwa MOR tidak berbeda jumlahnya pada gigi sensitif dan tidak sensitif karena stimulasi EPT yang menjadi dasar penggolongan sensitivitas gigi menyalurkan listrik untuk menstimulasi serabut A delta yang letaknya lebih dekat dentin dan lebih cepat menghantarkan nyeri tajam dibanding dengan serabut saraf C yang terletak lebih ke dalam dan lebih lambat menghantar nyeri tumpul.⁴¹ EPT juga tidak dapat menstimulasi serabut saraf C karena serabut C memiliki ambang rangsang yang lebih tinggi. Sebaliknya dalam kondisi patologis, seperti pulpitis irreversible, serabut C lebih mampu menghantarkan rangsang nyeri. Letak serabut C di bagian dalam pulpa, sehingga mampu bertahan lebih lama pada keadaan patologis. Oleh karenanya peran MOR dalam modulasi nyeri gigi diduga baru nampak pada keadaan patologis.

Pemberian agonis reseptor opioid untuk meredakan nyeri biasanya tidak lepas dari efek samping secara sentral, seperti konstipasi, toleransi, dan ketergantungan. Salah satu keuntungan pemberian agonis reseptor opioid perifer adalah untuk menghindari efek samping secara sentral tersebut. Telah diteliti tentang KOR di perifer yang dapat mengurangi sensasi *visceral* pada manusia tanpa menyebabkan konstipasi dan efek samping sentral lainnya.¹⁰ Oleh karena itu dengan ditemukannya MOR, KOR, dan DOR pada pulpa, dapat dikembangkan penelitian untuk pemberian agonis MOR, KOR, dan DOR pada pulpa untuk mengatasi nyeri akibat inflamasi pulpa dan setelah operasi gigi dan mulut.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Bedasarkan hasil penelitian ini dapatlah disimpulkan sebagai berikut:

1. Reseptor opioid terdapat pada pulpa manusia.
2. Untuk pertama kalinya, penelitian ini membuktikan keberadaan KOR dan DOR pada pulpa
3. Tidak ada perbedaan jumlah mRNA reseptor opioid μ , δ , dan κ pada gigi sensitif dan gigi tidak sensitif.
4. Reseptor opioid kurang berpengaruh terhadap sensitivitas gigi pada keadaan normal

B. Saran

Dapat dilakukan penelitian serupa namun pada gigi yang mengalami pulpitis untuk mengetahui sebaran reseptor opioid μ (MOR), δ (DOR), dan κ (KOR) dalam keadaan inflamasi. Diperlukan jumlah sampel yang lebih besar untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat. Selain itu, dapat dilakukan penelitian terhadap kadar opioid endogen yang terdapat pada pulpa gigi sehingga dapat diketahui hubungannya dengan reseptor opioid yang ada di pulpa. Penelitian ini dapat dikembangkan mengenai pemberian agonis MOR, KOR, atau DOR secara langsung pada kavitas atau intraperidonsium untuk menekan efek nyeri yang hebat pada keadaan pulpitis ataupun setelah operasi gigi dan mulut.

mRNA QUANTITATIVE DIFFERENCE OF μ , δ , AND κ OPIOID RECEPTORS BETWEEN SENSITIVE AND NON-SENSITIVE TEETH

Dental pain is the result of dentinal fluid flow or inflammatory mediator release such as substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP). SP and CGRP will activate nociceptive afferent C and A- δ nerve fibers in the pulp that lead to neurogenic inflammation.

Dentists often found various pain sensitivity level in their patients. Some people experience severe pain with small caries, while others have painless pulpitis. If this condition is ignored, it will lead to pulp necrosis. On the other hand, patients are difficult to detect painless pulpitis since they do not feel any pain before. This phenomenon occurs due to peripheral pain modulation mediated by endogenous opioid peptides, such as endorphin, dynorphin, enkephaline, and endomorphine. Endogenous opioid peptides will bind to and activate μ (MOR), δ (DOR), dan κ (KOR) opioid receptors to inhibit adenylyl cyclase. Consequently, it decreases the synthesis of cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Then opioid receptors will hyperpolarize the cell membrane to inhibit Ca^{2+} influx and open K^{+} channel to reduce action potential propagation and decrease SP and CGRP release. This mechanism will produce analgesia.

It was believed that antinociceptive effect of opioid is activated by opioid receptors in CNS, but studies showed that opioid receptors are also expressed in several peripheral organs, such as pancreas, small intestine, heart, and lung. This suggests that opioid peptides may play an important role in producing analgesia at peripheral level as well as at the CNS level.

Many studies showed that MOR was found on human dental pulp and DOR is found on molar rat pulp. The objective of this study is to confirm the expression of MOR and to determine the expression pattern of KOR and DOR in human dental pulp. Another objective is to quantify the difference of mRNA MOR, KOR, and DOR between sensitive and non-sensitive teeth.

This is an explorative-observational study with cross sectional method. Samples of this study are intact mandibular first premolar from healthy orthodontic

patient aged 12-18 years without any caries, attrition, open apex, erosion, anatomy defect, using orthodontic appliances or crown, allergic to local anesthetics, taking any medicine or alcohol within a week before the test, and having diabetes or heart diseases.

Every patient gave their informed consent after being explained and reading written details of the procedure. Five non-sensitive teeth and four sensitive teeth were selected after sensitivity test using Electric Pulp Tester (EPT). The EPT was placed on the buccal surface of the tooth and patient raised the left hand when they feel the first tingling sensation. Three EPT reading were made with recovery period of 1 minute. Then the mean of EPT reading were calculated. Tooth with EPT value is 20 or less is categorized as sensitive and more than 20 is categorized as non-sensitive.

Soon after being removed from its socket, the tooth was halved longitudinally and the pulp was accessed and cut into small pieces. The pulp was immediately immersed into betamercaptoethanol and buffer RLT to start the disruption process. Then the pulp was being homogenized on biosafety cabinet and mRNA were extracted using RNeasy Mini Kit. mRNA was amplified using Q-rt-RT-PCR. This study used SYBR Green as a dye for the quantification of double stranded DNA and GAPDH, the housekeeping gene, as an endogenous control to normalize the gene expression data in the quantitative analysis of RT-PCR. Primers sequences of mRNA MOR, KOR, and DOR were also provided.

The result showed that mRNA MOR, KOR, and DOR expression were detected in all samples. Using relative quantification, the ratio between the amount of target gene (MOR, KOR, and DOR) and control gene (GAPDH) is determined. It is proved that peripheral opioid receptors could interact with exogenous and endogenous opioid peptide to modulate the transmission of nociceptive information and produce analgesia before reaching the central nervous system.

The expression levels of mRNA MOR, KOR, and DOR in sensitive, non sensitive teeth, and an endogenous control (GAPDH) were evaluated. Fold change expression of mRNA MOR, KOR, and DOR in sensitive and non sensitive teeth were calculated using $\Delta\Delta C_t$ method. The expression of mRNA MOR is 0,95 fold

lower in sensitive teeth relative to non-sensitive teeth. The expression of mRNA KOR is 0,77 fold lower in sensitive teeth relative to non-sensitive teeth. The expression of mRNA DOR is 0,97 fold lower in sensitive teeth relative to non-sensitive teeth. Due to Ct values, mRNA MOR and KOR expression is categorized moderate (Ct value >25-30) and mRNA DOR expression is categorized high (Ct value >20-25). Shapiro-Wilk normality test showed that all data is normally distributed ($p > 0,05$). There is no significant difference in mRNA MOR, KOR, and DOR between sensitive and non-sensitive teeth ($p > 0,05$).

In conclusion, this study reports the presence of KOR and DOR in human dental pulp. There is no significant difference of mRNA MOR, KOR, and DOR quantification between sensitive and non-sensitive teeth.

This study used healthy or normal teeth as samples. Peripheral opioid receptors are identified in normal condition or in the presence of inflammation, but the presence of peripheral opioid receptors are more effective or become upregulated during inflammation. Thus, further research on pulpitis samples to determine the expression pattern of μ (MOR), δ (DOR), and κ (KOR) receptors during inflammation is needed. Studies with bigger samples are required to get more definitive results. Therefore, studies about endogenous opioids in pulp will be necessary to know the correlation to opioid receptors in the pulp. It is important to develop potent MOR, KOR, or DOR agonists placed into the cavity or intraperiodontium to reach long-lasting pain relief in pulpitis patients or postodontectomy.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gomez N. Dental Pulp Sensory Function. Pain. *ElectJournal Endod.* 2011;2:540-552.
2. Bender S. *Dental Pulp*. 2nd ed. (Hargreaves KM, Goodis HE TF, ed.). Illinois: Quintessence Publishing Co, Inc; 2012.
3. Jain N, Gupta A, Meena N. An insight into neurophysiology of pulpal pain: Facts and hypotheses. *Korean J Pain.* 2013;26(4):347-355. doi:10.3344/kjp.2013.26.4.347.
4. Fehrenbacher JC, Sun XX, Locke EE, Henry MA, Kenneth M. Capsaicin-evoked iCGRP release from human dental pulp: a model system for the study of peripheral neuropeptide secretion in normal healthy tissue. 2010;144(3):253-261. doi:10.1016/j.pain.2009.03.027.Capsaicin-evoked.
5. Kangarlou Haghighi A, Nafarzadeh S, Shantiaee Y, Naseri M, Ahangari Z. Relation between pulpal neuropeptides and dental caries. *Iran Endod J.* 2010;5(3):113-116. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4000687&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
6. Rechenberg D-K, Galicia JC, Peters OA. Biological Markers for Pulpal Inflammation: A Systematic Review. *PLoS One.* 2016;11(11):e0167289. doi:10.1371/journal.pone.0167289.
7. Glickman GN, Schweitzer JL. AAE - Colleagues for Excellence. *AAE - Colleagues Excell.* 2013;7. https://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/newsletters/endodontics_colleagues_for_excellence_newsletter/endodonticdiagnosisfall2013.pdf.
8. Chavarria-Bolanos D, Flores-Reyes H, Lombana-Sanchez N, Cerda-Cristerna B, Pozos-Guillen A. Sensory Neuropeptides and Endogenous Opioids Expression in Human Dental Pulp with Asymptomatic Inflammation: In Vivo Study. *Mediators Inflamm.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/879126.
9. Iwaszkiewicz KS, Schneider JJ, Hua S. Targeting peripheral opioid receptors to promote analgesic and anti-inflammatory actions. *Front Pharmacol.* 2013;4(OCT):1-7. doi:10.3389/fphar.2013.00132.
10. Vadivelu N, Mitra S HR. Peripheral opioid receptor agonists for analgesia: a comprehensive review. *J Opioid Manag.* 2011;7:1:55-68. doi:10.5055/jom.2011.0049.
11. Silbert SC, Beacham DW, McCleskey EW. Quantitative single-cell differences in mu-opioid receptor mRNA distinguish myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci.* 2003;23(1):34-42. doi:23/1/34 [pii].
12. Lesniak A, Lipkowski AW. Opioid peptides in peripheral pain control. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2011;71(1):129-138.
13. Jaber L, Swaim WD DR. Immunohistochemical Localization of Mu-opioid Receptors in Human Dental Pulp. *J Endod.* 2003;29:108-110.
14. Jinsong Penga, Sraboni Sarkara and SLC. Opioid receptor expression in

- human brain and peripheral tissue using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug Alcohol Depend.* 2012;124(3):223-228. doi:10.1016/j.drugalcdep.2012.01.013.
15. Fristad I, Berggreen E, Haug SR. Delta (??) opioid receptors in small and medium-sized trigeminal neurons supporting the dental pulp of rats. *Arch Oral Biol.* 2006;51(4):273-281. doi:10.1016/j.archoralbio.2005.08.007.
 16. Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: Peripheral mechanisms. *Jt Bone Spine.* 2005;72(5):359-371. doi:10.1016/j.jbspin.2004.01.010.
 17. Henry MA, Hargreaves KM. Peripheral Mechanisms of Odontogenic Pain. *Dent Clin North Am.* 2007;51(1):19-44. doi:10.1016/j.cden.2006.09.007.
 18. Christoph Stein, J. David Clark, Uhtaek Oh, Michael R. Vasko, George L. Wilcox, Aaron C. Overland, Todd W. Vanderah and RHS. Peripheral Mechanisms of Pain and Analgesia. *Brain Res Rev.* 2009;60(1):90-113. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.017.Peripheral.
 19. Evans N, Hayes J. *Textbook of Endodontology.* Vol 38.; 2005. doi:10.1111/j.1365-2591.2005.01039.x.
 20. Gopikrishna V, Pradeep G, Venkateshbabu N. Assessment of pulp vitality: A review. *Int J Paediatr Dent.* 2009;19(1):3-15. doi:10.1111/j.1365-263X.2008.00955.x.
 21. McDonald RE, Avery DR DJ. Eruption of the Teeth: Local, Systemic, and Congenital Factors That Influence the Process. In: Dean JA, Avery DR MR, ed. *Dentistry for the Child and Adolescent.* 9th ed. Missouri: Mosby Elsevier; 2011:150.
 22. Coghill RC. Individual Differences in Pain Sensitivity: Implications for Treatment Decisions. *Anesthesiol* 6. 2003;98:1312-1314.
 23. Nugroho D (Universitas Indonesia). Hubungan Sensitivitas Gigi Dengan Kanal Ion Natrium Tipe Nav1.8 Pada Nodus Ranvier Di Dalam Pulpa. 2008.
 24. Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Riley III JL. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain.* 2009;10(5):447-485. doi:10.1016/j.jpain.2008.12.001.Sex.
 25. Bowles WR1, Withrow JC, Lepinski AM HK. Tissue levels of immunoreactive substance P are increased in patients with irreversible pulpitis. *J Endod.* 29(4):265-267. doi:10.1097/00004770-200304000-00009.
 26. Sehgal N, Smith HS, Manchikanti L. Peripherally acting opioids and clinical implications for pain control. *Pain Physician.* 2011;14(3):249-258.
 27. Koneru A; Satyanarayana S; Rizman S. Endogenous Opioids : Their Physiological Role and Receptors. *Glob J Pharmacol.* 2009;3(3):149-153. doi:1992-0075.
 28. Mythri H, Arun A, Chachapan D. Pulp vitality tests - an overview on comparison of sensitivity and vitality. *Indian J Oral Sci.* 2015;6(2):41. doi:10.4103/0976-6944.162622.
 29. Abd-Elmeguid A, Yu DC. Dental pulp neurophysiology: Part 2. Current diagnostic tests to assess pulp vitality. *J Can Dent Assoc (Tor).*

- 2009;75(2):139-143.
30. Lin J, Chandler N, Purton D, Monteith B. Appropriate Electrode Placement Site for Electric Pulp Testing First Molar Teeth. *J Endod.* 2007;33(11):1296-1298. doi:10.1016/j.joen.2007.08.006.
 31. Bargale S, Davangere Padmanabh S. Appropriate electrode placement site of electric pulp tester for the premolars: A clinical study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2015;33(2):138. doi:10.4103/0970-4388.155128.
 32. Barber RD, Harmer DW, Coleman R a, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics.* 2005;21(3):389-395. doi:10.1152/physiolgenomics.00025.2005.
 33. Pfaffl MW. A-Z of quantitative PCR. In: Bustin SA, ed. *A-Z of Quantitative PCR*. 1st ed. California, USA: International University Line (IUL) Press; 2004:1-23.
 34. Caraguel CGB, Stryhn H, Gagné N, Dohoo IR, Hammell KL. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: Analytical and epidemiologic approaches. *J Vet Diagnostic Investig.* 2011;23(1):2-15. doi:10.1177/104063871102300102.
 35. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-622. doi:10.1373.
 36. Rebouças E de L, Costa JJ do N, Passos MJ, Passos JR de S, Hurk R van den, Silva JRV. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2013;56(1):143-154. doi:10.1590/S1516-89132013000100019.
 37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
 38. Shahib MN, Feranty ZA. Studies on Gene Expressions at the RNA Level Associated with the Senile Lens Changes in Human Lens Cataract. *Donnish J.* 2015;2(3):11-18.
 39. Lwanga S.K., Lemeshow S. Sample size determination in health studies A practice manual. *World Heal Organ.* 1991:38.
 40. Feng Y, He X CD. Current Research on Opioid REceptor Function. *Curr Drug Targets.* 2012;13(2)(Februari 2012):230-246.
 41. Goldberg M. *The Dental Pulp: Biology, Pathology, and Regenerative Therapies.*; 2014. doi:10.1007/978-3-642-55160-4.

Lampiran 1. Surat Persetujuan Etik



**Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Trisakti**

**Surat Persetujuan Etik (*Ethical Clearance*)
Untuk Penelitian Kesehatan yang Menggunakan Manusia sebagai Subyek Penelitian**

**PERSETUJUAN ETIK (*ETHICAL CLEARANCE*)
Nomor : 001/S2/KEPK/FGK/5/2017**

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

“PERBEDAAN JUMLAH mRNA RESEPTOR OPIOID μ , δ , DAN κ ANTARA GIGI SENSITIF DAN GIGI TIDAK SENSITIF”

yang mengikutsertakan manusia sebagai subyek penelitian, dengan Ketua Pelaksana / Peneliti Utama :

“Sheila Soesanto”

dapat disetujui pelaksanaannya. Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol.

Pada akhir penelitian, laporan pelaksanaan penelitian harus diserahkan kepada KEPK-FKG USAKTI. Jika ada perubahan protokol dan / atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Jakarta, 8 Mei 2017

Ketua KEPK-FKG USAKTI

Prof. Dr. drg. Loes D. Sjahruddin, M.Kes

Lampiran 2. Lembar Penjelasan Penelitian

LEMBAR PENJELASAN PENELITIAN

Dalam praktek sehari-hari, sering ditemukan pasien dengan lubang yang sudah dalam dan mencapai saraf gigi namun hal ini tidak menimbulkan gejala apapun pada pasien. Gigi dalam kasus ini perlu mendapat perawatan saluran akar untuk mencegah kematian gigi. Hal ini diduga terjadi karena ada reseptor opioid pada gigi yang bekerja untuk meredakan nyeri. Oleh karena itu akan dilakukan penelitian mengenai jumlah reseptor opioid pada gigi sensitif dan gigi tidak sensitif.

Penelitian ini dilakukan pada pasien yang berusia 12-18 tahun yang giginya akan dicabut sebelum prosedur pemakaian kawat gigi. Pasien dalam keadaan sehat, tidak mengkonsumsi obat-obatan atau alkohol seminggu sebelum pencabutan gigi, tidak memiliki riwayat penyakit jantung dan diabetes, tidak alergi terhadap obat anestesi lokal. Gigi yang dicabut dalam keadaan sehat, tidak berlubang, tidak ada kelainan anatomis, tidak memakai mahkota selubung, dan tidak memiliki riwayat trauma sebelumnya.

Pada penelitian ini, gigi Anda yang hendak dicabut akan saya ukur tingkat sensitivitasnya menggunakan EPT (*electric pulp tester*) yang lazim digunakan dalam kedokteran gigi untuk mengetahui keadaan saraf pada gigi seseorang. EPT akan mengeluarkan listrik dalam tingkat yang sangat rendah dan Anda akan merasakan sensasi menggelitik (bukan nyeri) pada gigi Anda. Anda diminta mengangkat tangan bila merasakan sensasi yang pertama kali Anda rasakan dan saya akan langsung menghentikan pemakaian alat tersebut. Pengukuran ini akan saya ulang sebanyak 3 kali dengan jeda 1 menit jeda antar pengukuran. Jadi total waktu yang dibutuhkan adalah sekitar 5 menit. Setelah itu gigi Anda akan dicabut dan gigi tersebut Anda akan saya bawa ke laboratorium untuk pemeriksaan lebih lanjut.

Melalui penelitian ini, Anda dapat mengetahui tingkat sensitivitas gigi Anda sehingga dapat mencegah terjadinya gigi yang berlubang besar dan dalam tanpa Anda ketahui. Penelitian ini tidak menimbulkan resiko apapun yang mempengaruhi kesehatan gigi atau kesehatan umum Anda. Apabila Anda berpartisipasi dalam penelitian ini, saya akan berterima kasih dan akan memberikan souvenir atas partisipasi Anda.

Anda berhak menolak mengikuti penelitian ini dan apabila Anda memutuskan untuk ikut, Anda juga berhak mengundurkan diri setiap saat. Tidak ada unsur paksaan atau sanksi

apapun pada penelitian ini. Keseluruhan data yang saya dapatkan akan digunakan hanya untuk keperluan penelitian yang saya jamin kerahasiaannya.

Anda dapat menanyakan hal yang belum jelas sehubungan dengan penelitian ini pada saya di nomor HP 08161970144 atau dapat menemui saya di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Usakti lantai 4 ekstension di Jl. Kyai Tapa, Jakarta Barat.

Atas kerjasama dan waktu yang Anda luangkan untuk penelitian ini, saya ucapkan terima kasih.

Hormat saya,

Drg. Sheila Soesanto

Lampiran 3. Lembar Persetujuan Subjek Penelitian (*Informed Consent*)

LEMBAR PERSETUJUAN SUBJEK PENELITIAN (*INFORMED CONSENT*)

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama :

Usia :tahun.....bulan

Alamat :

RT.....RW..... Kode pos :

Kelurahan : Kecamatan :

Kotamadya: Telpon :

Menyatakan bahwa setelah menerima penjelasan dan mengerti prosedur penelitian yang berjudul:

PERBEDAAN JUMLAH mRNA RESEPTOR OPIOID μ , δ , DAN κ ANTARA GIGI SENSITIF DAN GIGI TIDAK SENSITIF

Dengan ini **Bersedia / Tidak bersedia** (*) secara sukarela untuk berpartisipasi sebagai responden penelitian. Demikian pernyataan ini dibuat dan ditandatangani tanpa tekanan dan dengan kesadaran penuh.

Jakarta, _____, 2017

Penanggung jawab penelitian

Responden

Drg. Sheila Soesanto ()

(*) pilih salah satu

Lampiran 4. Uji Normalitas

	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
mRNA MOR	.260	9	.080	.841	9	.060
mRNA DOR	.190	9	.200	.952	9	.711
mRNA KOR	.281	9	.039	.917	9	.371

Lampiran 5. Uji beda

Independent Samples Test (mRNA MOR)

t-test for equality of means					
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	2.698	.144	(-).054	7	.958
Equal variances not assumed			(-).061	4.599	.954

t-test for equality of means					
95% confidence interval of the difference					
	Mean difference	Std. error difference	Lower	Upper	
Equal variances assumed	(-).06900	1.27228	(-3.07746	2.93946	
Equal variances not assumed	(-).06900	1.13832	(-3.07346	2.93564	

Independent Samples Test (mRNA KOR)

t-test for equality of means					
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	.119	.740	(-).695	7	.510
Equal variances not assumed			(-).683	6.108	.519

t-test for equality of means					
95% confidence interval of the difference					
	Mean difference	Std. error difference	Lower	Upper	
Equal variances assumed	(-).37950	.54632	(-1.67134	.91234	
Equal variances not assumed	(-).37950	.55526	(-1.73237	.97337	

Independent Samples Test (mRNA DOR)

t-test for equality of means					
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
Equal variances assumed	.201	.667	(-).225	7	.829
Equal variances not assumed			(-).229	6.903	.826

t-test for equality of means				
95% confidence interval of the difference				
	Mean difference	Std. error difference	Lower	Upper
Equal variances assumed	(-).03800	.16915	(-).43798	.36198
Equal variances not assumed	(-).03800	.16625	(-).43225	.35625

DAFTAR PUSTAKA

1. Gomez N. Dental Pulp Sensory Function. *Pain. Elect Journal Endod.* 2011;2:540-552.
2. Bender S. *Seltzer Dental Pulp*. 2nd ed. (Hargreaves KM, Goodis HE TF, ed.). Illinois: Quintessence Publishing Co, Inc; 2012; 159-184
3. Jain N, Gupta A, Meena N. An insight into neurophysiology of pulpal pain: Facts and hypotheses. *Korean J Pain.* 2013;26(4):347-355.
4. Fehrenbacher JC, Sun X, Locke EE, Henry MA, Kenneth M. Capsaicin-evoked iCGRP release from human dental pulp: a model system for the study of peripheral neuropeptide secretion in normal healthy tissue. 2010;144(3):253-261.
5. Kangarlou Haghghi A, Nafarzadeh S, Shantiaee Y, Naseri M, Ahangari Z. Relation between pulpal neuropeptides and dental caries. *Iran Endod J.* 2010;5(3):113-116.
6. Rechenberg D-K, Galicia JC, Peters OA. Biological Markers for Pulpal Inflammation: A Systematic Review. *PLoS One.* 2016;11(11):e0167289.
7. Glickman GN, Schweitzer JL. AAE - Colleagues for Excellence. AAE - Colleagues Excell. 2013;7. Available https://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/newsletters/endodontics_colleagues_for_excellence_newsletter/endodonticdiagnosisfall2013.pdf.
8. Chavarria-Bolanos D, Flores-Reyes H, Lombana-Sanchez N, Cerda-Cristerna B, Pozos-Guillen A. Sensory Neuropeptides and Endogenous Opioids Expression in Human Dental Pulp with Asymptomatic Inflammation: In Vivo Study. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:860126
9. Iwaszkiewicz KS, Schneider JJ, Hua S. Targeting peripheral opioid receptors to promote analgesic and anti-inflammatory actions. *Front Pharmacol.* 2013;4(Oct):1-7.
10. Vadivelu N, Mitra S HR. Peripheral opioid receptor agonists for analgesia: a comprehensive review. *J Opioid Manag.* 2011;7(1):55-68.

11. Silbert SC, Beacham DW, McCleskey EW. Quantitative single-cell differences in mu-opioid receptor mRNA distinguish myelinated and unmyelinated nociceptors. *J Neurosci*. 2003;23(1):34-42.
12. Lesniak A, Lipkowski AW. Opioid peptides in peripheral pain control. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71(1):129-138.
13. Jaber L, Swaim WD DR. Immunohistochemical Localization of Mu-opioid Receptors in Human Dental Pulp. *J Endod*. 2003;29:108-110.
14. Jinsong Penga, Sraboni Sarkara and SLC. Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissue using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug Alcohol Depend*. 2012;124(3):223-228.
15. Fristad I, Berggreen E, Haug SR. Delta opioid receptors in small and medium-sized trigeminal neurons supporting the dental pulp of rats. *Arch Oral Biol*. 2006;51(4):273-281.
16. Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: Peripheral mechanisms. *J Bone Spine*. 2005;72(5):359-371.
17. Henry MA, Hargreaves KM. Peripheral Mechanisms of Odontogenic Pain. *Dent Clin North Am*. 2007;51(1):19-44.
18. George L. Wilcox, Aaron C. Overland, Todd W. Vanderah and RHS. Peripheral Mechanisms of Pain and Analgesia. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):90-113
19. Evans N, Hayes J. *Textbook of Endodontology*. 2005; 38(12): 949
20. Gopikrishna V, Pradeep G, Venkateshbabu N. Assessment of pulp vitality: A review. *Int J Paediatr Dent*. 2009;19(1):3-15.
21. McDonald RE, Avery DR DJ. Eruption of the Teeth: Local, Systemic, and Congenital Factors That Influence the Process. In: Dean JA, Avery DR MR, ed. *Dentistry for the Child and Adolescent*. 9th ed. Missouri: Mosby Elsevier; 2011:150.
22. Coghill RC. Individual Differences in Pain Sensitivity: Implications for Treatment Decisions. *Anesthesiol* 6. 2003;98:1312-1314.
23. Santosa DN (Universitas Indonesia). Hubungan Sensitivitas Gigi Dengan Kanal Ion Natrium Tipe Nav1.8 Pada Nodus Ranvier Di Dalam Pulpa. Disertasi. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. Jakarta. 2008.

24. Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Riley III JL. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. *J Pain*. 2009;10(5):447-485.
25. Bowles WR1, Withrow JC, Lepinski AM HK. Tissue levels of immunoreactive substance P are increased in patients with irreversible pulpitis. *J Endod*. 29(4):265-267.
26. Sehgal N, Smith HS, Manchikanti L. Peripherally acting opioids and clinical implications for pain control. *Pain Physician*. 2011;14(3):249-258.
27. Koneru A; Satyanarayana S; Rizman S. Endogenous Opioids: Their Physiological Role and Receptors. *Glob J Pharmacol*. 2009;3(3):149-153.
28. Mythri H, Arun A, Chachapan D. Pulp vitality tests - an overview on comparison of sensitivity and vitality. *Indian J Oral Sci*. 2015;6(2):41.
29. Abd-Elmeguid A, Yu DC. Dental pulp neurophysiology: Part 2. Current diagnostic tests to assess pulp vitality. *J Can Dent Assoc (Tor)*. 2009;75(2):139-143.
30. Lin J, Chandler N, Purton D, Monteith B. Appropriate Electrode Placement Site for Electric Pulp Testing First Molar Teeth. *J Endod*. 2007;33(11):1296-1298.
31. Bargale S, Davangere Padmanabh S. Appropriate electrode placement site of electric pulp tester for the premolars: A clinical study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2015;33(2):138.
32. Barber RD, Harmer DW, Coleman R a, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005;21(3):389-395.
33. Pfaffl MW. A-Z of quantitative PCR. In: Bustin SA, ed. *A-Z of Quantitative PCR*. 1st ed. California, USA: International University Line (IUL) Press; 2004:1-23.
34. Caraguel CGB, Stryhn H, Gagné N, Dohoo IR, Hammell KL. Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: Analytical and epidemiologic approaches. *J Vet Diagnostic Investig*. 2011;23(1):2-15.

35. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-622.
36. Rebouças E de L, Costa JJ do N, Passos MJ, Passos JR de S, Hurk R van den, Silva JRV. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Brazilian Arch Biol Technol*. 2013;56(1):143-154.
37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
38. Shahib MN, Feranty ZA. Studies on Gene Expressions at the RNA Level Associated with the Senile Lens Changes in Human Lens Cataract. *Donnish J*. 2015;2(3):11-18.
39. Lwanga S.K., Lemeshow S. Sample size determination in health studies A practice manual. *World Heal Organ*. 1991:38.
40. Feng Y, He X CD. Current Research on Opioid Receptor Function. *Curr Drug Targets*. 2012;13(2):230-246.
41. Goldberg M. *The Dental Pulp: Biology, Pathology, and Regenerative Therapies.*; 2014.