JITEKGI 2023, 19 (2): 72-77
diterbitkan di Jakarta

Jurnal Ilmiah dan Teknologi Kedokteran Gigi FKG UPDM (B)

ISSN 1693-3079
eISSN 2621-8356

IDENTIFIKASI BAKTERI *PORPHYROMONAS ENDODONTALIS* PADA INFEKSI SALURAN AKAR MELALUI ANALISIS GEN 16S rRNA

Nurani Hayati[*], Ihsan Firdaus[**], Azyyati Patricia Zikir[*]
*Departemen Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prof. Dr. Moestopo (B), Jakarta
**Departemen Konservasi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prof. Dr. Moestopo (B), Jakarta
Korespondensi:Nurani Hayati, nuranihayati@dsn.moestopo.id

ABSTRAK

Latar belakang: bakteri *Porphyromonas endodontalis* merupakan bakteri batang, pigmen hitam Gram-negatif yang kehadirannya dalam saluran akar umumnya dikaitkan dengan periodontitis, gingivitis, dan nekrosis pulpa. Bakteri-bakteri pigmen hitam umumnya sulit didapat dengan metode kulturisasi konvensional dikarenakan kulturisasi dengan kondisi anaerob obligat sangat memakan waktu dan memerlukan kondisi kultur yang rumit. Metode analisis gen 16S rRNA merupakan metode yang digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi bakteri pathogen pada specimen klinis dengan cara menduplikasi DNA dan mengidentifikasi DNA bakteri target. **Tujuan:** penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri *Porphyromonas endodontalis* pada saluran akar terinfeksi secara *in vitro* dengan menggunakan metode analisis gen 16s rRNA. **Metode:** spesimen sampel didapat dari pasien RSGM Universitas Trisakti Jakarta yang melakukan perawatan saluran akar dengan diagnosis nekrosis pulpa. Spesimen koloni bakteri yang dicurigai sebagai bakteri pigmen hitam Gram-negatif anaerob disubkultur hingga ditemukan koloni bakteri murni yang berwarna hitam kehijauan atau kecoklatan. Setelah itu diidentifikasi dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR), pengecatan Gram, morfologi koloni dan mikroskopik. Identifikasi PCR dengan kontrol menggunakan bakteri *Porphyromonas endodontalis* strain ATCC® 35406D-5™ dan primer *forward* (5'-GCT-GCA-GCT-CAA-CTG-TAG-TCT-TG-3') serta primer *reverse Porphyromonas endodontalis* (5'-TCA-GTG-TCA-GAC-GGA-GCC-TAG-TAC-3'). **Hasil:** hasil amplifikasi divisualisasikan melalui *UV-Transluminator.* Pemeriksaan elektroforesis DNA pada sampel memperlihatkan pita yang berada sangat mendekati nilai 500 bp yang diduga merupakan bakteri *Porphyromonas endodontalis* pada saluran akar. **Kesimpulan:** hasil penelitian memperlihatkan terdapat bakteri *Porphyromonas endodontalis* di dalam saluran akar spesimen sampel. Metode PCR yang mentargetkan gen 16S rRNA merupakan cara yang efektif dan efisien dalam mengidentifikasi bakteri yang sulit untuk didapatkan melalui metode kulturisasi seperti bakteri pigmen hitam *Porphyromonas endodontalis.*

Kata kunci: Gen 16s rRNA, *Porphyromonas endodontalis,* bakteri pigmen hitam, *polymerase chain reaction*, infeksi saluran akar, kultur bakteri

ABSTRACT

Background: *Porphyromonas endodontalis is a rod, Gram-negative black pigmented bacteria which its presence in root canals is commonly associated with periodontitis, primary endodontic infection, gingivitis and pulp necrosis. Black pigmented bacteria present difficulties in conventional culture techniques since culturing in an obligate anaerobic environment is such a time consume and it requires very complicated culture conditions. The 16S rRNA gene analysis method is a method used to detect and identify pathogenic bacteria in clinical specimens, by duplicating DNA and identifying DNA in target bacteria.* ***Purposes:*** *this study is a descriptive study that aims to identify the bacteria Porphyromonas endodontalis in root canals in vitro.* ***Methods:*** *Specimens of bacterial colonies suspected of being anaerobic Gram-negative black pigment bacteria were subcultured until a greenish-black or brownish-black pure bacterial colony was found. After that, it was identified using polymerase chain reaction (PCR), Gram stain, colony morphology and microscopy. PCR identification with control using Porphyromonas endodontalis strain ATCC® 35406D-5TM and forward primer (5'-GCT-GCA-GCT-CAA-CTG-TAG-TCT-TG-3') and reverse primer Porphyromonas endodontalis (5'-TCA -GTG-TCA-GAC-GGA-GCC-TAG-TAC-3').* ***Results:*** *DNA electrophoresis examination on the sample showed the presence of bands that were on the same line, which was close to the value of 500 bp.* ***Conclusion:*** *The PCR method targeting the 16S rRNA gene is an effective and efficient way to identify bacteria that are difficult to obtain by culture methods such as the black pigment bacteria, Porphyromonas endodontalis.*

Keywords: *Porphyromonas endodontalis, black pigmented bacteria, polymerase chain reaction, infected root canal, bacteria culture*

PENDAHULUAN

Infeksi saluran akar sebagian besar disebabkan oleh infeksi oportunistik pada ruangan pulpa dengan mikroorganisme rongga mulut komensal.[1,2] *Porphyromonas endodontalis* merupakan bakteri batang gram negatif yang kehadirannya dalam saluran akar umumnya dikaitkan dengan periodontitis, infeksi endodontik primer, gingivitis, dan nekrosis pulpa.[3] Kolonisasi mikroba ini dapat menyebabkan lesi periapikal dengan gejala akut seperti nyeri, bengkak, dan supurasi.[4] Selain itu pada beberapa penelitian bakteri ini juga dikaitkan dengan kondisi kronis dari periodontitis.[5,6]

Pada tahun 2015 terdapat literatur pertama yang melaporkan kehadiran *Porphyromonas endodontalis* pada penyakit meningitis yang ditemukan dengan menggunakan metode analisis gen 16S rRNA pada sampel.[7] Selain itu meskipun bakteri ini tidak memiliki prevalensi yang tinggi pada infeksi sekunder saluran akar seperti pada *Enterococcus faecalis,* namun Liljestrand dkk (2016), menyatakan bahwa *Porphyromonas endodontalis* yang ditemukan dalam rongga mulut dapat berperan menyebabkan penyakit sistemik serta mampu menginvasi sel-sel endotel arteri jantung.[8,9]

Bakteri pigmen hitam atau *black-pigmented bacteria* (BPB) memberikan tantangan dalam teknik kultur secara konvensional dikarenakan kulturisasi dengan lingkungan anerobik obligat sangat memakan waktu dan memerlukan kondisi kultur yang sangat rumit.[10,11] Selain itu, BPB membentuk koloni-koloni hitam dengan karakteristik biologis yang serupa, sehingga sangat sulit untuk membedakan antar spesies dengan hanya berdasarkan kultur.[12] Zhuang (2013) menyatakan bahwa beberapa tahun terakhir, teknologi deteksi bakteri dengan berbasis PCR (*polymerase chain reaction*) telah menggantikan proses kultur bakteri dalam mendeteksi bakteri patogen dikarenakan kemampuan deteksinya yang cepat (kurang dari 1 jam), dan sensitivitasnya yang tinggi (dapat mendeteksi hingga koloni tunggal).[13] Sejumlah besar teknik biologi molekular telah diaplikasikan untuk mengidentifikasi spesies bakteri yang terdapat dalam saluran akar terinfeksi selama beberapa tahun terakhir. Gomez, dkk., (2018) juga menyatakan bahwa teknik PCR dapat memberikan sensitivitas yang lebih tinggi tanpa adanya keterbatasan yang dimiliki oleh metode kulturisasi.[14]

Penelitian mengenai bagaimana mekanisme bakteri *Porphyromonas endodontalis* yang berasal dari saluran akar dan manifestasinya terhadap tubuh masih sedikit sekali dilakukan terutama di Indonesia. Hal ini disebabkan belum terdapat penelitian yang berhasil mengidentifikasi dan mengisolasi bakteri tersebut dari saluran akar yang terinfeksi pada masyarakat Indonesia.[15]

Metode kultur bakteri telah lama menjadi pilihan dalam mengidentifikasi bakteri karena biayanya yang terjangkau dan mudah. Meskipun demikian pada bakteri pigmen hitam (BPB) memberikan tantangan tersendiri dalam teknik kultur secara konvensional dikarenakan kulturisasi dengan lingkungan anerobik obligat sangat memakan waktu dan memerlukan kondisi kultur yang sangat rumit.[10,11] Metode analisis gen 16S rRNA merupakan metode yang digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi bakteri-bakteri pathogen pada spesimen klinis, dengan cara menduplikasi DNA dan mengidentifikasi DNA pada bakteri target yang memiliki tingkat keberhasilan yang tinggi. Metode ini seringkali digunakan pada kasus ketika dicurigai terjadi infeksi bakteri namun hasil kultur bakteri tetap negatif.[16]

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif untuk mengidentifikasi dan mengisolasi bakteri *Porphyromonas endodontalis* di dalam saluran akar secara *in vitro*. Kriteria inklusi pada sampel penelitian ini adalah gigi dengan infeksi saluran akar kronis dan akut, sedangkan kriteria eksklusi adalah gigi dengan saluran akar yang belum tertutup sempurna, gigi dengan kelainan perkembangan dan pertumbuhan, gigi dengan infeksi rekuren, dan gigi molar ke-3. Sebanyak 10 sampel pada gigi dengan diagnosis nekrosis pulpa diambil dengan menggunakan *paper point* steril dari saluran akar terinfeksi. Ujung *paper point* kemudian dipotong dengan gunting steril dan dimasukkan ke dalam *plastic tube* yang berisi 3ml media transport (37 gr *brain heart infusion*, 0,5 ml 0,1 *resazurin solution*, 1 gr agar, 0,5 gr *L-cystein* HCL, 4gr Na_2CO_3 dalam 1000 ml *distilled water*) selama 48 jam dan diberi label. Sampel dilakukan kultur sebelum 1 jam kemudian. Sampel dalam media transport digetarkan dengan *vortex mixer* selama 30 detik, kemudian 1 ml sampel diencerkan dengan 9 ml *dilution buffer* dan dibuat 5 kali pengenceran. Larutan sampel yang telah diencerkan sebanyak 0,5 ml ditanam dalam media agar darah yang terdiri dari 2 ml *brucella broth* ditambahkan 0,4 µl/ml vitamin K_1 dan 5 µl/ml hemin kemudian diberi 10% *sheep blood*. Penanaman dilakukan menggunakan *swab* steril dan dioleskan pada permukaan media agar. Media dan bakteri dimasukkan ke dalam sungkup anaerob serta diinkubasi dalam udara yang mengandung 80% N_2, 10% H_2 dan 10% CO_2 ,menggunakan *Gas Pack CO generating sachet* dengan suhu 37°C selama 7-14 hari. Setiap spesimen diambil 10 koloni bakteri yang dicurigai sebagai *Black-pigmented* Gram negatif anaerob untuk isolasi *P. endodontalis*. Selanjutnya dilakukan subkultur hingga ditemukan koloni bakteri murni yang berwarna hitam kehijauan atau kecoklatan. Setelah itu diidentifikasi dengan menggunakan *polymerase chain reaction*, pengecatan Gram, morfologi koloni dan mikroskopik. Sebagai kontrol digunakan bakteri *Porphyromonas endodontalis* strain ATCC® 35406D-5™.

Pembuatan suspensi bakteri berdasarkan standar Brown III yaitu dengan menggunakan ose steril diambil 4-5 ose bakteri dan dilarutkan dalam larutan NaCl fisiologis. Kemudian suspensi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri *P. endodontalis* dilarutkan kembali dengan media *Brain Heart Infussion* (BHI) cair hingga mencapai konsentrasi 10^6 CFU/ml. Sebagian dari masing-masing sampel kemudian dimasukkan ke dalam *cryo* untuk disimpan dan sebagian lagi dilakukan ekstraksi DNA dengan menggunakan metode *heat shock* dan kemudian dikonfirmasi dengan PCR menggunakan target 16S rRNA bakteri *P. endodontalis* dengan primer (5' □ 3'): –ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT- dengan *amplicon* 672 basepair.[17] Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Lee dkk. (2012), hasil PCR diaplikasikan *ethidium bromide* dengan perbandingan dengan sampel yaitu 3:2, kemudian dianalisis melalui 1% gel agarosa dan dilakukan elektroforesis pada 60 V selama 2,5 jam, dan difotografi dibawah sinar UV.[18]

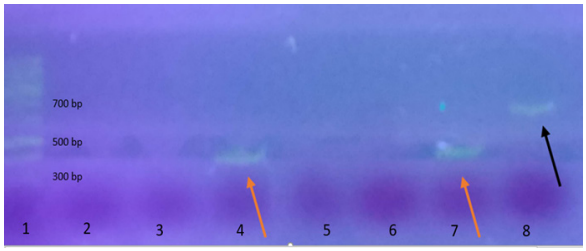
Penelitian dilakukan di Laboratoriom Micore Universitas Trisakti Jakarta pada bulan Maret-April setelah mendapatkan persetujuan etik melalui Surat Keterangan Komisi Ilmiah Penelitian No: 024/KIP/FKGUPDMB/I/2022.

HASIL PENELITIAN

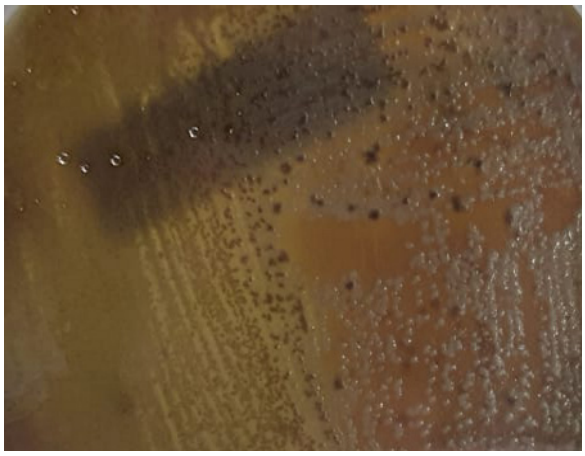
Hasil yang didapat dari 10 sampel hanya 8 sampel yang dapat digunakan, dan pemeriksaan elektroforesis DNA pada sampel nomor 5 dan 8 memperlihatkan adanya pita yang berada pada garis yang sama, yang berada mendekati nilai 500 bp (Gambar 1).

Kedua sampel yang teridentifikasi oleh PCR (kolom nomor 4 dan 7 dengan tanda panah oranye) kemudian dilakukan kultur kembali pada medium agar darah yang telah dicampur dengan 0,0005% hemin; 0,05% *L-cystein* HCL; 0,5% *yeast extract*, dan 0,001% menadione / vitamin K dan kembali dilakukan inkubasi selama 14 hari dengan kondisi anaerob pada suhu 37ºC. Setelah 14 hari hanya agar pada sampel nomor 4 dan 7 memperlihatkan terbentuknya beberapa koloni hitam (Gambar 2). Langkah selanjutnya kemudian dilakukan pemilihan koloni hitam secara selektif untuk mendapatkan hasil isolasi yang murni yang diambil dari sampel nomor 4 dan 7 kemudian dikultur ulang kembali kedalam *enhanced* medium cair dan diinkubasi selama 14 hari dengan kondisi anaerob pada suhu 37ºC. Pewarnaan Gram pada sampel memperlihatkan gambaran bakteri batang Gram positif (warna merah muda) yang masih sedikit bercampur dengan berbagai bakteri Gram positif (Gambar 3).

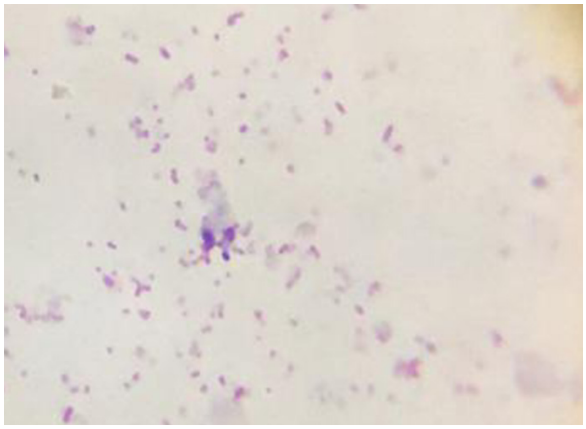
Strain bakteri *Porphyromonas endodontalis* ATCC® 35406D-5™ dipilih untuk digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan target species bakteri yang sama dengan yang digunakan di penelitian. Bakteri ATCC® 35406D-5™ dalam bentuk *dried freeze* dibuka dalam ruang anaerob dengan cara memecah *vial*. Sebanyak 1ml *enhanced* medium cair dimasukkan kedalam *vial* untuk merehidrasi seluruh kandungan di dalam *vial*. Kemudian cairan medium yang telah bercampur dengan bakteri kembali dimasukkan dan dicampur dengan 5 ml medium cair di dalam *tube*, dan sebagian di inokulasi ke dalam *enhanced* medium agar darah.



Gambar 1. Elektroforesis DNA. Kolom 1 = *Ladder*, kolom 2-7 = sampel no. 1-6, kolom 8 = kontrol positif DNA *Porphyromonas endodontalis* dengan 672 bp.



Gambar 2. Koloni hitam pada kultur agar darah sampel.



Gambar 3. Pewarnaan Gram pada sampel memperlihatkan koloni bakteri Gram positif (ungu) dan Gram negatif (merah muda) yang masih bercampur.

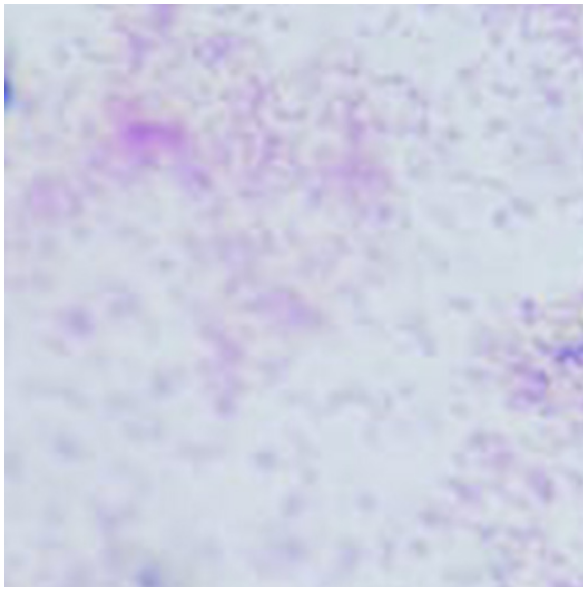
Semua tindakan dilakukan dalam kondisi anaerob. Medium cair dan agar darah diinkubasi selama 14 hari dengan kondisi anaerob pada suhu 37ºC.

Setelah 14 hari didapat koloni murni *black pigmented* bakteri *P. endodontalis* pada agar darah **(**Gambar 4**)**. Pada pewarnaan Gram terlihat koloni murni batang Gram negatif berwarna merah muda (Gambar 5).

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini masing-masing sampel DNA bakteri yang didapat dari saluran akar kemudian dilakukan analisis PCR menggunakan target 16S rRNA bakteri *P.endodontalis* dengan primer spesifik dengan sekuens *forward* –GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC- dan *reverse* –CCG CTT CAT GTC ACC ATC TC- dengan *amplicon* 672 *basepair*. Hasil PCR dibaca dengan menggunakan elektroforesis pada 60V selama 2,5 jam dan memperlihatkan garis pita DNA pada sampel di kolom nomor 4 dan 7 yang berada hampir sejajar dengan *ladder* 500 *basepair*. Selain itu kultur bakteri pada sampel di kolom nomor 4 dan 7 memperlihatkan terbentuknya beberapa koloni hitam yang menyerupai tampilan koloni bakteri *P. endodontalis* ATCC® 35406D-5™.

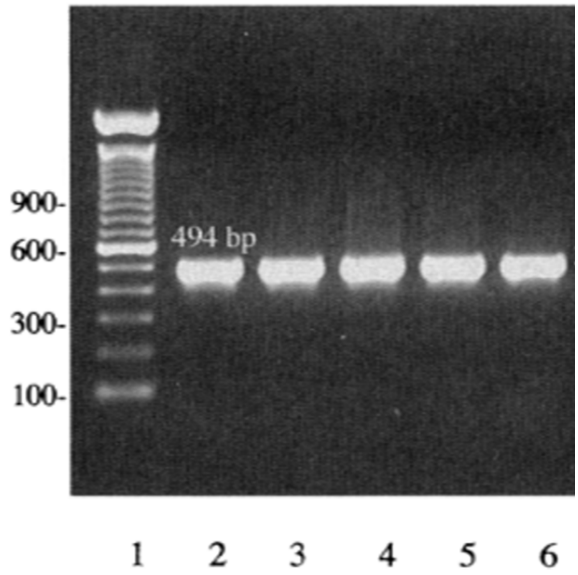
Gambar 4. Koloni murni bakteri *P. endodontalis* pada agar medium darah



Gambar 5. Pewarnaan Gram pada bakteri *P. endodontalis* murni.

Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Fouad dkk., Siqueiera dkk., dan Gomes dkk. (2002), yang berhasil mengidentifikasi bakteri *P.endodontalis* dengan *amplicon* 672 *basepair* dari saluran akar**.** [10, 17, 19] Meskipun demikian, penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Odell dkk. (1999), yang telah melakukan identifikasi bakteri *P. endodontalis* dari saluran akar dengan *amplicon* 494 *basepair.*[32] Dalam penelitiannya tersebut, Odel dkk. (1999), melakukan isolasi bakteri *P.endodontalis* dari saluran akar terinfeksi yang disertai dengan lesi periradikular dengan tujuan mengidentifikasi kehadiran gen kolagenase bakteri yang berpotensi sebagai virulen factor. Odell dkk. (1999), membandingkan DNA *P. endodontalis* isolat saluran akar dengan ATCC-35406 sebagai kontrol positif dan primer spesifik dengan *amplicon* 494 *basepair,* yang menyerupai nilai *amplicon* yang didapat pada DNA bakteri yang di-isolasi dalam penelitian ini.[19] (Gambar 6).

Metode kultur dan molekular seringkali di-gunakan untuk mendeteksi spesies bakteri pada infeksi saluran akar. Meskipun metode kultur dapat meng-identifikasi spesies predominan atau spesies spesifik pada infeksi endodontik, namun tingkat akurasi pada tindakan kultur bakteri cenderung lebih rendah, terutama bila menggunakan media non-selektif dengan keterbatasan deteksi rata-rata hanya 10^3 – 10^4 sel-sel bakteri.[20]



Gambar 6. Hasil elektroforesis amplifikasi 16S rRNA pada penelitian Odell dkk. Nomor 1: 100bp DNA *ladder*; 2: DNA *strain P. endodontalis* ATCC 35406; 3-6 DNA berbagai bakteri *P.endodontalis* isolat klinis yang berbeda.[19]

Penelitian yang dilakukan Gomes dkk. (2018), menyatakan bahwa isolasi bakteri *P. endodontalis* memiliki tingkat keberhasilan yang sangat kecil melalui metode kultur (1%), namun *P. endodontalis* umumnya seringkali ditemukan melalui metode PCR dalam saluran akar.[10] Hal ini disebabkan sifatnya yang sangat sensitif terhadap oksigen dan merupakan mikroorganisme yang sangat sulit untuk tumbuh. Alasan ini merupakan penjelasan kegagalan tindakan kultur pada beberapa spesies *Porphyromonas*, meskipun *P. gingivalis* seringkali dapat dikultur melalui tindakan yang sangat berhati-hati akan paparan oksigen.[2]

Kanamisin dan vankomisin umumnya digunakan dalam mengisolasi kultur bakteri batang anaerob *black-pigmented* secara selektif, namun diketahui bahwa vankomisin dapat menghambat pertumbuhan *P. endodontalis* pada konsentrasi 5 µg/ml.[32] Dibandingkan dengan bakteri batang anaerob *black-pigmented* lainnya, tingkat isolasi dengan metode kultur bakteri *P. endodontalis* seringkali sulit dilakukan oleh karena sifatnya yang sangat sensitif terhadap oksigen. Toleransinya yang rendah terhadap oksigen ini dapat menjadi kemungkinan penyebab rendahnya tingkat isolasi spesies bakteri ini pada penelitian-penelitian sebelumnya.[10,19]

Pada penelitian ini kultur bakteri isolasi saluran akar telah dilakukan hingga pemilihan koloni *black-pigmented* pada agar darah sampel nomor 5 dan 8 yang dicurigai terdapat kehadiran bakteri *P. endodontalis*. Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Blanca dkk. (2012), bakteri *P. endodontalis* menunjukkan pertumbuhan yang optimum pada kultur 37°C dan lingkungan dengan tingkat oksigen yang rendah.[5] *P. endodontalis* merupakan bakteri batang Gram negatif, perwarnaan hitam, tidak membentuk spora dan menggunakan substrat nitrogen sebagai sumber energi. Pigmen hitam akan terlihat pada koloni setelah 7 hari hingga 14 hari. Pigmen utama yang terkait dengan warna yang gelap adalah protoheme, meskipun protoporphyrin juga dapat memberikan pewarnaan hitam.[5] Bakteri ini akan membentuk koloni yang konveks, halus mengkilat, dan berdiameter 1-2 mm dengan koloni berwarna hitam kecoklatan.[7] Namun demikian pewarnaan Gram pada kedua sampel pada penelitian ini masih memperlihatkan berbagai jenis bakteri yang heterogen dan belum memperlihatkan kultur murni bakteri *P. endodontalis*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Bakteri saluran akar *Porphyromonas endodontalis* merupakan mikroorganisme anaerob obligat yang sangat sensitif terhadap oksigen atmosferik. Toleransi oksigen yang rendah dari *P.endodontalis* menyebabkan rendahnya angka isolasi spesies ini. Bakteri *P.endodontalis* dalam penelitian ini dapat teridentifikasi dengan metode kultur maupun PCR namun belum dapat terisolasi secara murni dari saluran akar.

Oleh karena itu langkah selanjutnya adalah subkultur kembali bakteri pada medium selektif dengan menggunakan kanamisin atau vankomisin dan membandingkan kembali bakteri secara fenotip dan genotip dengan strain *P. endodontalis* ATCC® 35406D-5™ sebagai kontrol positif setelah masa inkubasi 14 hari.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis telah mengungkapkan kepentingan publikasi yang disetujui sepenuhnya tanpa potensi konflik yang dapat timbul di kemudian hari.

DAFTAR PUSTAKA

1. Devi K, Priya V, Gayathri R. Evaluation of inflammatory markers in endotoxins induced root canal infection. *Drug Invention Today Vo. 10.* 2018. Hal 887-91
2. Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in Root canal infection before and after chemomechanical preparationwith 2.5% Sodium hypochlorite. *Journal of Endodontic. Vol. 34.* 2008. Hal 268-72
3. Cao H H, Qi ZZ, Jiang H H, et.al. Detection of *Porphyromonas endodontalis, Porphyromonas gingivalis,* and *Prevotella intermedia* in primary endodontic infections in a Chinese population. *International Endodontic Journal.* 2012:45 (8), 773-81
4. Asao, K. Pathogenic factors of *Porphyromonas endodontalis*. *Dental Journal of Iwate Medical University, 27 (3).* 2002: 187-196
5. Blanca T, Bedran L, et. al. *Porphyromonas endodontalis* in chonic periodontitis: a clinical and mocrobiological cross-sectional study. *Journal of Microbiology,* 2012: 4
6. Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 2003; 82: 338_44.
7. New W.D, Pryce M.T. Meningitis caused by *Porphyromonas endodontalis* detected by PCR amplification and sequencing of 16S rRNA genes direct from cerebrospinal fluid and cerebral tissue. *JMM Case Reports.* 2015. 1-4
8. Li, Xiaojing., Kolltveit M. K, Tronstad Leif, Olsen Ingar. Systemic disease caused by oral infection. *Clinical microbiology reviews*. 2000. 547-58.
9. Fouad F Ashraf. Endodontic Microbiology Second Edition. John Wiley & Sons, Inc: USA. 2017. 400
10. Gomes B.P.F.A, Jacinto R.C, Pinheiro E.T, et.al. *Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas endodontalis, Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiology Immunol.* 2005: 20: 211-215
11. Siqueira Junior JF, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* Vol. 18(4): 2007. 267-80.
12. van Winkelhoff AJ, Martijn van Steenbergen TJ, de Graaff J. *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *endodontalis*: Its role in endodontal infections. J. Endod. 1992:18(9); 431-4. DOI: 10.1016/s0099-2399(06)80843-5

13. Zhuang, B. (2013). *Microfluidic Devices for Biomedical Applications || Integrated microfluidic systems for genetic analysis, 465–494e.* doi:10.1533/9780857097040.4.465
14. Gomes B.P.F.A, Herrera D.R. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Braz Oral Res. Vol.32 (suppl): e69*. 2018. 82-110.
15. Hayati. N, Widyarman A.S, Roeslan B.O. Effectiveness of Grapefruit (*Citrus paradisi*) and Lime (*Citrus aurantifolia*) Against Pathogenic Root Canal Biofilms. International Journal of Pharmaceutical Research. 2020; Vol 12:Issue 3.
16. Rampini SK, Bloemberg GV, Keller PM, Büchler AC, Dollenmaier G, Speck RF, Böttger EC. Broad-range 16S rRNA gene polymerase chain reaction for diagnosis of culture-negative bacterial infections. Clin Infect Dis. 2011 Dec;53(12):1245-51.
17. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, Hazlett K, Radolf JD. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. J Clin Microbiol. 2002 Sep;40(9):3223-31.
18. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. J Vis Exp. 2012 Apr 20;(62):3923. doi: 10.3791/3923. PMID: 22546956; PMCID: PMC4846332.
19. Siquiera Jr J.F, Rocas I.N, Oliveira J.C.M, Santos K.R.N. Molecular Detection of Black-pigmented Bacteria in Infection of Endodontic Origin. *JOE.* Vol.27 Issue 9, September 01, 2001. P.563-6.
20. . Lynnetta J. Odell, J. Craig Baumgartner, Tian Xia, Larry L. David, Survey for collagenase gene prtC in Porphyromonas gingivalis and Porphyromonas endodontalis isolated from endodontic infections. Journal of Endodontics, Volume 25, Issue 8, 1999.Pages 555-558.
21. Gholoobi A, Masoudi-Kazemabad A, Meshkat M, Meshkat Z. Comparison of Culture and PCR Methods for Diagnosis of Mycobacterium *tube*rculosis in Different Clinical Specimens. Jundishapur J Microbiol. 2014 Feb;7(2).