

Isolasi gen kariogenik gtf BC Streptococcus mutans dari plak gigi anak

(The isolation of Streptococcus mutans cariogenic gtf BC gene from children's tooth plaque)

Yetty Herdiyati Soemantadiredja* dan Mieke Hemiawati Satari**

* Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Anak

** Bagian Mikrobiologi

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran
Bandung - Indonesia

ABSTRACT

The aim of this research was to prove that Streptococcus mutans isolated from children's tooth plaque was cariogenic. Gtf BC which is glycosyltransferase producer gene has had a role in caries development. This gene was isolated from Streptococcus mutans. The specimens were analyzed using Wizard Genomic DNA Purification Kit from Promega. In conclusion, S. mutans isolated from children's tooth plaque truly had cariogenic gtf BC gene.

Key words: Streptococcus mutans, gen 16s rRNA, gen gtf BC

Korespondensi (correspondence): Yetty Herdiyati Soemantadiredja, Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Anak, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran. Jln. Sekeloa Selatan I Bandung 40132, Indonesia.

PENDAHULUAN

Karies gigi merupakan suatu penyakit umum yang sering ditemukan sejak pertama terdapat sejarah kehidupan manusia. Dr. WD Miller (1980) merupakan orang pertama yang menggambarkan karies sebagai aksi dari asam organik terhadap kalsium fosfat pada gigi. Ia memperlihatkan bila gigi diinkubasi dengan saliva dan karbohidrat, asam akan terbentuk dan menguraikan bagian gigi yang termineralisasi. Ia menyimpulkan bahwa asam yang dibentuk oleh bakteri dalam saliva menguraikan gigi. Dari penelitian ini ia merumuskan teori "kemo-parasitik" dari karies gigi. Sejak saat itu banyak data yang mendukung teori menurunnya pH oleh produksi asam bakteri akan menghasilkan penguraian email. Penelitian Dr. Miller telah membentuk dasar untuk teori "plak-tuan rumah-substrat" dari pembentukan karies. Proses pembentukan karies gigi disebabkan oleh multifaktor, pada dasarnya dapat disederhanakan menjadi hubungan yang tidak seimbang antara daya tahan gigi dengan faktor kariogenik.¹

Email yang 95% terkalsifikasi merupakan struktur yang sangat termineralisasi dari tubuh manusia. Mayoritas mineralnya adalah hidroksiapatit yang merupakan keluarga garam kalsium fosfat. Formula umum yang diungkapkan untuk hidroksiapatit adalah $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$. Hidroksiapatit murni merupakan struktur yang unik, terdapat sumbu simetris enam kali lipat di sekeliling suatu sumbu simetris tiga kali lipat. Kristalnya tersusun dalam konfigurasi heksagonal dengan atom kalsium dan fosfor pada kristal terluar. Di bagian tengah kristal, kelompok hidroksil dikelilingi oleh tiga atom kalsium. Hubungan

dari masing-masing kelompok hidroksil berperan penting dalam kestabilan kristal. Bahkan penggantian sejumlah kelompok hidroksil murni dengan atom dalam seperti fluoride menghasilkan peningkatan stabilitas kristal. Kristal heksagonal ini dikelompokkan bersama menjadi sebuah batang. Email terbentuk dari banyak batang yang dipadatkan bersama menjadi sebuah batang. Batang ini terbentang dari permukaan email ke *dental junction*. Ukuran kepadatan atau densitas dari email menunjukkan bahwa permukaan luar memiliki densitas yang sedikit lebih tinggi daripada struktur lain. Ruang antar batang email merupakan matriks organik. Meskipun email kelihatannya sangat keras dan termineralisasi dengan baik, permukaannya berpori dengan adanya ion kecil seperti sodium, potassium, magnesium dan fluoride. Keberadaan ruang interprismatik ini telah digunakan untuk menjelaskan permeabilitas yang terlihat pada email.¹

Hidroksiapatit memiliki konstanta kemampuan untuk larut yang pasti bergantung pada temperatur, pH dan kekuatan ionik dari pelarut yang mengelilingi kristal. Di rongga mulut, saliva mengalami supersaturasi dalam hal kalsium dan fosfat yang menguntungkan bagi keadaan kristal email dan dengan demikian gigi tidak terurai secara bertahap seumur hidup. Akibat dari sifat reaksi seimbang dalam rongga mulut, email berada dalam keadaan mineralisasi konstan dan demineralisasi pada kondisi fisiologis (Ca_2PO_4 , pH 6,8). Pada pH ini kemampuan untuk larut sangat kecil.

Meskipun demikian, jika pH diturunkan sampai sekitar 1,3 log unit sampai 5,5 maka kemampuan untuk larut meningkat sampai penguraian terjadi produksi asam dari

bakteri dan pembentukan karies gigi yang terjadi setelahnya merupakan titik puncak dari suatu proses yang sangat selektif dari perlekatan bakteri dan kolonisasi bakteri pada permukaan gigi. Bila hal ini terus berlanjut akan mengarah pada pembentukan plak. Plak gigi terdiri dari sekumpulan sel besar dan kecil atau sel individual dari berbagai spesies bakteri yang berbeda serta matriks interbakterial dengan komposisi heterogenus dan bervariasi. Meskipun demikian, organisme asidogenik spesifik, yaitu yang berasal dari kelompok *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) saat ini secara umum dianggap memiliki peranan khusus dalam etiologi karies gigi. *S. mutans* merupakan salah satu pemicu karies karena bakteri ini memiliki enzim glikosiltransferase yang berperan sebagai prekursor dalam perkembangan plak gigi, namun tidak semua plak gigi dapat menyebabkan karies gigi.⁷

BAHAN DAN METODE

Rancangan penelitian adalah observasional yang bersifat eksploratif yaitu dengan uji diagnostik laboratoris untuk menentukan bahwa deteksi kuman *Streptococcus mutans* dapat menggunakan gen 16srRNA dengan PCR, dari 15 sampel yang digunakan dalam penelitian ini hanya 1 yang berhasil terdeteksi sebagai *Streptococcus mutans*.

Bahan penelitian adalah plak gigi anak yang dicampur dalam *bulyon* kemudian campuran ini diencerkan hingga 10^{-3} → 10^{-5} . Pemiakan dilakukan pada media TYCSB kemudian diinkubasikan secara anaerob selama 3×24 jam. Ekstraksi DNA dengan metode Wizard Genomic DNA Purification Kit dari Promega.^{2,3}

Adapun larutan yang harus disiapkan: EDTA 50 mM pH 8,0; *lysozim* 10 mg/mL; isopropanol; etanol 70. Peralatan yang digunakan berupa Tabung mikro 1,5 mL; *Waterbath* 37° C dan 80° C.

Cara kerja: hasil ekstraksi DNA ditambahkan 1 ml *overnight* kultur ketabung 1,5 ml kemudian disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 13.000-16.000 × g, supernatan dibuang, selanjutnya sel di resuspensi kedalam larutan 480 μL EDTA 50 mM. Tambahkan 60 μL *lysozim* 10 mg/mL dengan menggunakan pipet secara hati-hati hingga semua sel tersuspensi, kemudian di inkubasi pada suhu 80° C selama 5 menit untuk melisis sel dan selanjutnya didinginkan di dalam suhu ruang. Tambahkan 3 μL larutan RNase ke dalam tabung kemudian sampel dicampur dengan menginversi tabung sebanyak 2–5 kali, setelah itu diinkubasi selama 15–60 menit pada suhu 37° C, biarkan sampel mencapai suhu ruang, selanjutnya ditambahkan larutan 200 μL protein precipitation dan *vortex* pada kecepatan tinggi selama 20 detik lalu di inkubasi di dalam es selama 5 menit, kemudian disentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan 13.000–16.000× g.

Supernatan yang mengandung DNA dipindahkan ke tabung 1,5 mL yang mengandung 600 μL isopropanol suhu ruang, campurkan larutan dengan inversi sampai terlihat rantai DNA yang seperti benang halus. Lalu sentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 13.000-16.000× g, kemudian dengan hati-hati dekantasi supernatan dan keringkan tabung dengan membalikkan di atas kertas *tissue* yang bersih. Tambahkan 300 μL etanol 70 temperatur ruang dan inversi tabung beberapa kali untuk mencuci DNA pelet, kemudian dilakukan sentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 13.000–16.000× g, buang etanol dengan hati-hati. Keringkan tabung dengan konsentrator, atau balikan tabung pada kertas *tissue* bersih selama 10–15 menit. Tambahkan 50 μL larutan DNA rehidrasi selanjutnya DNA disimpan pada suhu 2–8° C.

PCR gen 16s rRNA

Primer yang digunakan adalah untuk Universal reverse primer: Uni B: 5'–GGTTC(G/C) TTGTTACGACTT-3' dan Eubacterial forward primer: BactFI: 5'–AGAGTTTGATC (A/C)TGGCTAC-3'.

Hasil optimasi PCR, dilakukan Denaturasi awal pada suhu 94° C selama 2 menit, Siklus amplikasi 30 siklus, kemudian di Denaturasi 94° C selama 1 menit, Annealing 48° C selama 1 menit, Elongation 72° C selama 1 menit, pasca Elongation 72° C selama 10 menit. Melalui elektroforesis hasil PCR dengan menggunakan Agarose DNA, diperoleh sebuah larik, dengan ukuran 1400 pb.

Reaksi sekuensing: 16s rRNA

Primer yang digunakan : 357 F: 5'- TAG GGG AGG CAG CAG-3'; 807 F: 5' GAT TAG ATA CCC TGG TAG-3'; 1114F: 5' - GCA ACG AGC GCA ACC A -3'; 519 R: 5' - GTA TTA CCG CGG CTG CRG-3'; 909 R: 5' - CCG TCA ATT CAT TTG AGT-3'.

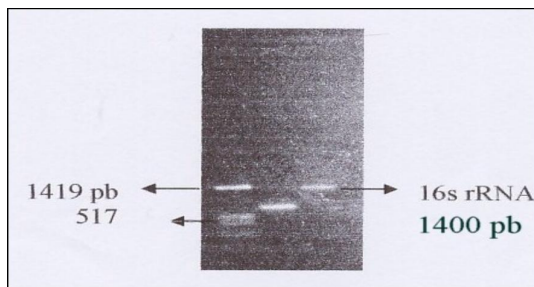
Prosedur kerja: Isolasi kromosom *Streptococcus mutans* dengan menggunakan metode lisis cepat. Tujuannya adalah untuk memperoleh *template* yang akan digunakan pada amplifikasi gen glikosiltransferase dengan metode PCR.

PCR gen gtf BC

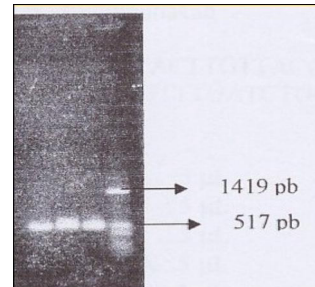
Hasil optimasi PCR, dilakukan denaturasi awal 94° C selama 2 menit, siklus amplifikasi 40 siklus, denaturasi 94° C selama 1 menit, *Annealing* 50° C selama 1 menit Elongasi 72° C selama 1 menit, pasca elongasi 72° C 10 menit.

HASIL

Hasil isolasi gen 16s rRNA yang diperoleh memiliki panjang 1400 pb. Setelah dilakukan homologi dengan *Streptococcus mutans* UA 101 melalui program komputer DNA star, maka diyakini bahwa bakteri hasil isolat gigi anak tersebut adalah *Streptococcus mutans*, tampak pada gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Hasil elektroforesis DNA 16s rRNA.
1. Marka DNA puc HIN F, pita pertama berukuran 1419 pb, pita kedua berukuran 517 pb.
2. Hasil PCR, 16s rRNA berukuran 1400 pb.



Gambar 2. Hasil elektroforesis DNA gtf BC.
No. 1–3 Hasil PCR gen gtf BC
No. 4 Marka DNA puc HIN F, pita pertama berukuran 1419 pb, pita kedua berukuran 517 pb.

ABI	Model Version 2.1.1	2*16S rRNA YEtty	Signal G:101 A:151 T:77 C:33 DT6%Ac(A Set-AnyPrimer)	Page 1 of 1 Tue, Oct 21, 2003 7:19 AM					
1	TNNTNNTTN	NNNCGCCAA	CTGAATTAGA	AGNTTTACAA	AACCAATATG	ATAAATTACA	AGAATTAGGC	GTAATGTAT	80
81	TCTCAGTTT	AACTGATACT	CATTTCTGAC	ACAAAGCTTG	GCATGATCAT	TCAGATGCTA	TTAGCAAAT	CCAATACAAT	160
161	ATGATTGGT	ACCCTTCACA	AACTATTACT	CGTAACCTCG	ACGTATTAGA	TGAAGAACTT	GGTTTAGCTC	AACGTGGTAC	240
241	TTTCATTAT	GATCCTGATG	GTGTTGTTCA	AGCAGCTGAA	ATCAATGCTG	ACGGTATCGG	CCGTGACGCA	AGCACATTAG	320
321	TTCAAAAAT	CAAAGCTGCT	CAATATGTAC	GTCAACATCC	AGGTGAAATT	TTGCCCTGCA	AAATGGGAAN	AAAGTTCNGA	400
401	AACTTTACAA	CCANGATTAG	ACTATAGTGT	ANATTAAGG	AAGCNTNACC	CAANATGCTT	NNTGCNGATT	CAAACACAAT	480
481	TTNNACACC	NCTTACCTT	TTGGANNNGG	NCTTTNAATT	CCNCCCTANC	NNNGGTCNNA	CCTTATCCCN	CANTTNACNN	560
561	ANTCTTCNT	GTTTNCNANT	NTTNCNCCCC	NNTTCCGNNA	TTCCNCACN	TNCCTCNTCC	CNTTNTNCC	CNGNTAAAA	640
641	CGCTCNCCC	CGNGNNNNN	TNTAAATNN	NCNCNTTCT	TNCTNCCNT	NTCTTTCNTT	CCCTNCCNCC	NNTCTNCCCT	720
721	TCCTCNTNT	NCCNCCNCC	CCCCCTTNN	CTNNNNCCCC	CTCNCTCCC	CCTNCCNCT	TTCCCNNTT	CNNTCCCCNC	800
801	CCNCTCCNT	NCNCTCCCC	CNNCTCCNC	NCTTTNNTC	TCNCTCCNC	NNCTNCCNNT	CTCCCCNNN	NTCTNCTCT	880
881	TNTCNTCTC	CCNCTCCNC	CNCTNTNCT	CCNCTCTC	NNTCNNTC	TCTCTNTCT	NTNNCTCTC	TTNCTCTCC	960
961	NCTCCCTT								1040

Gambar 3. Hasil Analisa SEQUENSING gen 16s rRNA

PEMBAHASAN

Untuk dapat mengisolasi *S. mutans* secara tepat maka saat ini dapat digunakan deteksi *Streptococcus mutans* secara molekuler yaitu dengan mengamplifikasi 16s rRNA. Setiap bakteri memiliki 16srRNA yang merupakan suatu subunit dari RNA ribosom. Subunit ini memiliki daerah konservatif yang berguna untuk menentukan alignment yang tepat dari suatu prokariot. Disamping itu daerah ini mengandung pula sejumlah mutan yang bervariasi di tempat lain yang menjadi ciri khas untuk filogenetik suatu bakteri.

Gen gtf BC adalah suatu polimer glukosa ekstraseluler yang bersifat tidak larut dalam air yang dikenal sebagai salah satu faktor virulensi dalam karies. Gen gtf BC adalah salah satu gen yang mengkode enzim yang bertanggung jawab untuk sintesis glukukan yang tidak larut dalam air yang dikenal sebagai *IG (insoluble glukukan)*.^{2, 4-6}

Penggunaan *Streptococcus mutans* UA 101 sebagai kontrol disebabkan bakteri ini memperlihatkan sifat kariogenik, karena memiliki gen gtf B atau gtf BC. Hasil isolasi gtf BC dengan panjang 517 pb menunjukkan bahwa hasil isolat *Streptococcus mutans* dari gigi anak ini bersifat kariogenik. *Streptococcus mutans* secara konstitutif akan mensekresikan GTF yang dikode oleh gen gtf. Gen gtf ini membentuk suatu operon yang terdiri dari gtf A, B, C, D

dan yang berperan dalam pembentukan karies adalah gtf B dan gtf BC, glukukan ini bersifat tidak larut dalam air, karena itu adanya kedua gen ini menunjukkan bahwa bakteri *Streptococcus mutans* tersebut mampu menyebabkan terjadinya karies.

Berdasarkan penelitian ini disimpulkan bahwa, hasil isolat *Streptococcus mutans* dari plak gigi anak menunjukkan adanya gen gtf BC yang dapat mengekspresikan glukukan yang tidak larut air dan bersifat kariogenik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Newman MG, Nisengard R. Oral Microbiology and immunology. Philadelphia: WB Saunders Co; 1988. p. 432–8.
2. Baker GC. Identification of Indonesian hyperthermophiles using 16 sr RNA Sequencing. Bandung: PPAU Bioteknologi ITB; 1999.
3. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Biology of Microorganisms 9th ed. New Jersey: Prentice Hall Inc. 2000.
4. Russel RRB, Ivic A. The use of DNA probes for the identification of oral Streptococci Caries. Res 1989; 23:110–2.
5. Chia JS, Yang CS, Chen JY. Functional analysis of a conserved region in glucocyltransferase of Streptococcus Mutans. J Infection and Immunity 1998; 66(10):4747–903.
6. Yamashita Y, Bowen WH, Kuramitsu HK. Molecular analysis of a Streptococcus mutans strain exhibiting polymorphism in the tandem gtf Bang gtf BC genes. J Infection and Immumty 1992; 60(4):1618–24.