

# **Penggunaan Teknik PCR Pada Deteksi Gen gtf B/C Karies Gigi Anak**

Yetty Herdiyati Nonong\*, Mieke Hemiawati Satari\*\*

\* Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Anak

\*\* Bagian Mikrobiologi

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran

## **Abstrak**

Gen gtf B/C dapat dikaitkan dengan proses terjadinya karies gigi, tidak setiap bakteri yang memproduksi menyebabkan karies mengandung gen gtf B/C.

Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan cara yang paling mudah, akurat dan mutakhir untuk mengetahui adanya gen gtf B/C penyebab karies gigi.

Penelitian secara eksperimental laboratories dilakukan terhadap 7 sampel yang diambil dari karies gigi anak.

Hasil penelitian menunjukkan banyak bakteri didalam karies yang mengandung gen gtf B/C antara lain : Lactobacilus Fermentum, Lactobacilus Salivarius, Klebsiela Oxytoca, Streptococcus Mutans, Streptococcus Constelatus, Streptococcus Bovis, Streptococcus Anginosus.

Kesimpulannya adalah teknik PCR memudahkan terdeteksinya gen gtf B/C yang ada pada bakteri penyebab karies.

**Kata Kunci** : PCR, Gen gtf B/C, Karies.

## ***The PCR Technic In Detection of gtf B/C Gen of Children Dental Caries***

### ***Abstract***

*The gtf B/C are recognized as important factor of dental caries, but not all cariogenic bacteria contained the gtf B/C gen.*

*The aim of the research is to determined the easy, cheap, accurate and up to date the etiology of caries, the gtf B/C gen.*

*The research was done by laboratory experimental, samples consist 7 samples collected from children dental caries.*

*The result showed many caries bacteria contained gtf B/C gen : Lactobacillus Fermentum, Lactobacillus Salivarius, Klebsiela Oxycitoca, Streptococcus Mutans, Streptococcus Constelatus, Streptococcus Bovis, Streptococcus Anginosus.*

*The conckusion is the PCR technic can detected of gtf B/C gen more easy in cariogenic bacteria.*

*Key Words : PCR, Gen gtf B/C, Caries.*

### **Pendahuluan**

PCR adalah singkatan dari *Polymerase Chain Reaction*. Teknik ini merupakan teknik perbanyak DNA secara *in vitro* yang memungkinkan adanya amplikasi antara dua region DNA yang diketahui, hanya di dalam tabung reaksi, tanpa perlu memasukkannya ke dalam sel (*in vitro*).

PCR merupakan suatu teknik yang memiliki beberapa keunggulan. Yaitu sangat sensitif, karena dapat mengamplifikasi DNA yang jumlahnya tidak banyak. Selin itu,

memiliki spesifitas yang tinggi dan waktu yang diperlukan untuk melakukannya juga cukup singkat (kurang dari 24 jam), serta sangat ideal untuk mengidentifikasi pathogen dengan cepat dan akurat.

Dalam system kerjanya, PCR dilandasi oleh struktur DNA. Dalam keadaan *nativenya*, DNA merupakan double helix, yang terdiri dari dua buah pita yang berpasangan antiparalel satu dengan yang lain dan berikatan dengan ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen terbentuk antara basa-basa yang komplementer, yaitu antara basa Adenin (A) dengan Thymine (T) dan Guanine (G) dengan Cytosin (C). Basa-basa ini terikat dengan molekul gula, deosiribosa, dan setiap satu molekul gula berikatan dengan molekul gula melalui ikatan fosfat. Ada 3 tahap utama di dalam setiap siklusnya, yaitu :

#### 1. Denaturasi

Selama proses denaturasi, double stranded DNA akan membuka menjadi single stranded DNA. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusanya ikatan hidrogen diantara basa-basa komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya.

#### 2. Annealing

Primer akan menuju daerah yang spesifik, dimana daerah tersebut memiliki komplemen dengan primernya. Pada proses annealing ini, ikatan hidrogen akan terbentuk. Selanjutnya, DNA polymerase akan berikatan sehingga ikatan hydrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, misalnya pada 72<sup>0</sup>C.

#### 3. Reaksi Polimerisasi (*Extention*)

Umumnya, reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai ini, terjadi pada suhu 72<sup>0</sup>C. Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan dengan dNTP yang komplemen pada sisi 3'nya. Jadi, seandainya ada 1 copy gen sebelum siklus berlangsung,

setelah satu siklus, akan menjadi 2 copy, sesudah 2 siklus akan menjadi 4, sesudah 3 siklus akan menjadi 8 copy dan seterusnya. Sehingga diperoleh amplifikasi DNA antara  $10^6$ - $10^9$  kali (Wostorn et al, 1992, Retroningrum, 1997).

Pada penelitian ini telah dipilih bakteri yang berasal dari karies gigi anak untuk di deteksi menggunakan PCR. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi gen *gtf B/C* pada bakteri penyebab karies, dengan mengisolasi kromosom bakteri-bakteri yang berasal dari karies gigi anak. Amplifikasi gen target dengan teknik PCR menggunakan kromosom sebagai templat, dan produk PCR dideteksi dengan metode elektroforesis aganosa.

## **Bahan dan Metode**

### **Bakteri Identifikasi *S. Mutans***

Sampel berupa bakteri dari 7 karies gigi anak terlebih dahulu dimurnikan untuk mengetahui keberadaan *S. mutans*. Analisis dilakukan melalui uji pada media perbenihan lempeng agar TYCSB, dan pewarnaan Gram. *S. mutans* akan tampak mempunyai karakteristik yang khas baik pada media perbenihan maupun pada pengamatan morfologinya di bawah mikroskop. Selain itu, analisis terhadap *S. mutans* juga dilakukan melalui uji biokimia, dengan mengamati kepekaannya terhadap manitol, sorbitol, eskulin, arginin, melibiose, dan rafinose. Serta identifikasi 16 srDNA. Untuk mengetahui apakah yang diperoleh itu benar bakteri sekaligus meneliti ulang *S. mutans* yang telah di isolasi, setelah amplifikasi gen 16s rDNA dilakukan sekuensing selanjutnya dilakukan homologi dengan bakteri yang terdapat di gen Bank menggunakan program DNA Star.

### **Media dan Bahan Kimia**

*Blood* agar plate, media cair TYCSB, buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,6 EDTA 1 mM, SDS 10%; larutan fenol: kloroform (1:1); natrium asetat 3 M; agarosa (Promega Corporation,

Madison, USA); TAE 50x (242 gr Tris base, 57,1 ml asam asetat glacial, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8 dalam 1 liter aquades); etidium bromida (10 mg/ml); *loading buffer* (0,25% bromofenol biru 0,25% xylene cyanol F.F, 15% ficol).

Mutans primer gen rRNA 16 sr DNA

Reverse 5'GGTTC(G/C)TTGTTACGACTT3'

Forward 5'AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTAC3'

Mutans primer gen gtf B/C

Reverse 5'ATCATATTGTCGCCATCATC3'

Forward 5'AGAGTTTCCGTCCTTACTG3'. Taq DNA polymerase (Pharmacia, Biotech, USA) 5 U/μl; buffer PCR 1x yang diencerkan dari buffer PCR 10x (KCl 500 mM, Tris HCl 100 mM pH 8,3 pada temperature kamar, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, gelatin 0,1% (b/v)); dNTP 200μM; aquabides steril dan minyak mineral.

Isolasi kromosom *Streptococcus mutans*. Bakteri dari kultur beku digoreskan pada permukaan plat agar darah steril, dan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama satu malam. Koloni *Streptococcus mutans* diinokulasi dalam 1,5 ml media cair TYCSB dan diinkubasi selama 6 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C tanpa pengocokan. Kultur kemudian dipindahkan ke dalam 15 ml media cair TSB dan diinkubasi semalam pada supernatan, dan etanol absolut, lalu diinkubasi pada suhu -20<sup>0</sup>C selama satu malam. Campuran disentrifugasi 6.000 rpm selama 10 menit. Endapan dicuci dengan 1 ml etanol 70%, disentrifugasi 6.000 rpm selama 10 menit, endapan dikeringkan pada temperatur ruang, kemudian tambahkan 25 μl aquabides. Larutan DNA 5 μl dielektroforesis pada agarosa 1% yang mengandung larutan etidium bromida dan marker standar λ Hind III.

Persiapan gel agarosa. Agarosa 1% dan 1,5% dibuat dalam bufer 1x TAE, didinginkan sampai suhu 60<sup>0</sup>C, kemudian ditambahkan 1 μl larutan etidium bromida (10 mg/ml), lalu diaduk. Larutan agar dituangkan kedalam plat. Kemudian ditambahkan 10 μl sample DNA

dicampur dengan 2  $\mu$ l *loading buffer* dimasukkan kedalam sumur. Marker DNA yang ukurannya diketahui  $\lambda$  n film kecepatan tinggi.

Amplifikasi gen 16s rDNA dilakukan dengan kondisi larutan PCR sebagai berikut: denaturasi awal 94<sup>0</sup>C selama 2 menit, denaturasi 94<sup>0</sup>C 1 menit, annealing 48<sup>0</sup>C selama 1 menit, Elongation 72<sup>0</sup>C selama 1 menit, Pasca Elongation 72<sup>0</sup>C selama 10 menit, siklus amplifikasi 30 siklus.

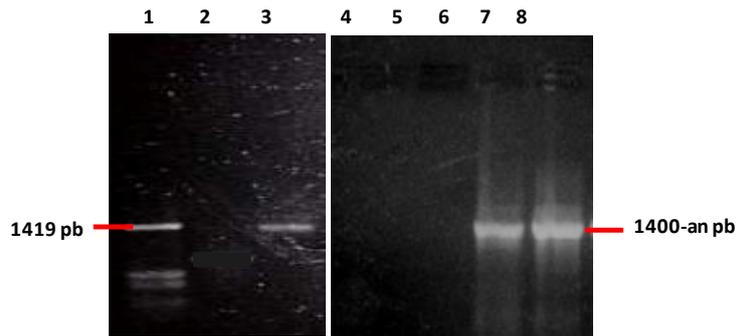
Amplifikasi gen gtf B/C dilakukan dengan kondisi larutan PCR primer sebagai berikut : denaturasi awal 94<sup>0</sup>C selama 2 menit, denaturasi 94<sup>0</sup>C 1 menit, annealing 50<sup>0</sup>C selama 1 menit, Elongation 72<sup>0</sup>C selama 1 menit, Pasca Elongation 72<sup>0</sup>C selama 10 menit, siklus amplifikasi 35 siklus.

Produk PCR yang didapat dideteksi dengan elektroforesis agarosa. Pita-pita yang terbentuk pada gel agarosa dideteksi menggunakan transiluminator ultra violet dan selanjutnya difoto dengan film 3300 ASA.

## **Hasil dan Pembahasan**

### **Identifikasi Bakteri dengan Pendekatan 16s rDNA**

Dalam menentukan ukuran produk PCR 16s rDNA digunakan marker DNA yaitu pUC19 yang direstriksi dengan enzim restriksi *HinfI* (pUC19/*HinfI*). Hasil restriksi memberikan pita DNA dengan ukuran 1419 pb. Produk amplifikasi fragmen 16s rDNA berukuran 1400 sampai 1500an pb (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil amplifikasi gen *16s rDNA* dengan Panjang Pita 1400-an pb

Keterangan Produk PCR: 1. Penanda berat molekul pUC-*Hinf*I; 2. Isolat K1; 3. Isolat K2; 4. Isolat K3; 5. Isolat K4; 6. Isolat K5; 7. Isolat K6; 8. Isolat K7.

Hasil sekuensing menunjukkan bahwa bakteri yang berhasil diidentifikasi dari karies gigi anak adalah *Lactobacillus Fermentum*, *Lactobacillus Salivarius*, *Klebsiela Oxytoca*, *Streptococcus Mutans*, *Streptococcus Constelatus*, *Streptococcus Bovis*, *Streptococcus Anginosus*.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Bakteri dengan Pendekatan *16s rDNA*

No	Sampel	Kategori sampel	Nama Bakteri	Homologi (%)
1	K1	Karies Gigi	<i>Lactobacillus fermentum</i>	93%
2	K2		<i>Lactobacillus Salivarius</i>	94 %
3	K3		<i>Klebsiella oxytoca</i>	96%
4	K4		<i>Streptococcus mutans</i>	97%
5	K5		<i>Streptococcus constellatus</i>	85%
6	K6		<i>Streptococcus Bovis</i>	96%
7	K7		<i>Streptococcus anginosus</i>	85%

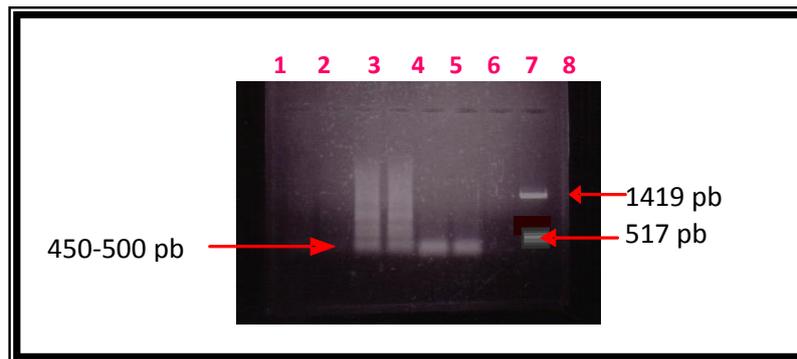
Keterangan: Bakteri-bakteri yang teridentifikasi dihomologikan dengan data bakteri yang ada pada *Gen Bank*, persentasi (%) menunjukkan tingkat homologinya.

Berdasarkan hasil penelitian pada tabel 1 di atas, teridentifikasi ke 7 sampel bakteri yang tingkat homologinya antara 85% sampai 97%, berarti yang ditemukan benar-benar bakteri.

## Identifikasi Bakteri Kariogenik melalui Amplifikasi Fragmen Gen *gtf* B/C

Gen *gtf* *S. mutans* secara konstitutif akan mengekspresikan GTF yang dikode oleh gen *gtf*. Gen *gtf* ini membentuk suatu operon yang terdiri dari *gtf* B/C yang masing-masing operon *S. mutans* memiliki daerah yang conserve dan variabel dimana masing-masing enzim GTF dikode oleh gen *gtf* B/C. Adanya daerah yang variabel tersebut mengharuskan adanya kesesuaian primer yang dirancang dan digunakan.

Gen yang berperan pada proses pembentukan karies hanyalah gen *gtf* B/C. Sifat gen B adalah mengekspresikan glukon yang tidak larut sedangkan gen *gtf* C mengekspresikan glukon larut dan tidak larut. Panjang gen *gtf* B/C secara total berukuran sekitar 600 pb (Gambar 2).



Gambar 2. Amplifikasi Fragmen Gen *gtf* B/C dengan Panjang Pita Kurang dari 600 pb

Tabel 2. Hasil Amplifikasi Fragmen Gen *gtf* B/C

No	Sampel	<i>16s rDNA</i>	Panjang Pita Teramplifikasi	Kategori sampel
1	K1	<i>Streptococcus mutans</i>	600 pb	Rampan karies
2	K2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	700 pb	
3	K3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	600 pb	
4	K4	<i>Streptococcus anginosus</i>	500 pb	
5	K5	<i>Streptococcus constellatus</i>	700 pb	
6	K6	<i>Streptococcus Bovis</i>	500 pb	
7	K7	<i>Streptococcus bovis</i>	600 pb	

Keterangan: Panjang pita yang teridentifikasi menunjukkan gen *gtf* B/C teramplifikasi.

Keberhasilan untuk menentukan bahwa sampel tersebut adalah suatu bakteri ditunjukkan dengan teramplifikasinya gen pengkode *16s rDNA* menggunakan primer universal yang akan mengenali semua bakteri. Dalam menentukan ukuran produk PCR *16s rDNA* digunakan marker DNA yaitu pUC 19 yang direstriksi dengan enzim restriksi *Hinfl* (pUC 19/*Hinfl*). Hasil restriksi memberikan pita DNA dengan ukuran 1419 pb. Produk amplifikasi fragmen *16s rDNA* berukuran sekitar 1400 pb.

Produk PCR *16srDNA* ini kemudian diambil untuk dilakukan sekuensing, pembacaan hasil sekuensing digunakan *DNA STAR*, dengan primer *16s rDNA*. Setelah itu dilakukan analisis homologi dengan data bakteri yang ada di *Gen Bank* hasil homologi ternyata didapatkan bukan hanya *S. mutans* saja tetapi juga bakteri lain, yaitu *Lactobacillus Fermentum*, *Lactobacillus Salivarius*, *Klebsiela Oxytoca*, *Streptococcus Mutans*, *Streptococcus Constelatus*, *Streptococcus Bovis*, *Streptococcus Anginosus*, *Streptococcus Constelatus*.

Hal ini diduga karena banyak bakteri rongga mulut yang telah resisten terhadap basitrasin, hal ini sesuai dengan pendapat Ruoff<sup>4</sup> yang juga menyatakan bahwa terdapat beberapa bakteri rongga mulut telah menjadi resisten terhadap basitrasin sehingga sulit untuk mengisolasi *S. mutans*, dengan demikian didapatkan tidak hanya koloni *S. mutans* saja, tetapi juga koloni bakteri lain.

Meskipun demikian, yang penting dikemukakan adalah bahwa toleransi terhadap asam merupakan ciri bakteri kariogenik pada gigi. Berdasarkan hasil penelitian, *Lactobacillus Fermentum*, *Lactobacillus Salivarius*, *Klebsiela Oxytoca*, *Streptococcus Mutans*, *Streptococcus Constelatus*, *Streptococcus Bovis*, *Streptococcus Anginosus* adalah bakteri yang ditemukan dari gigi karies yang sudah tentu merupakan lingkungan cukup asam, maka

diduga bakteri-bakteri tersebut tahan terhadap asam. Oleh sebab itu dapat dikatakan bahwa keberadaan karies tidak identik dengan keberadaan *S. mutans*.

Pada penelitian ini didapat fragmen gen gtf B/C dengan panjang yang berbeda-beda bagi setiap spesies bakteri, hal ini disebabkan karena gen gtf B/C ini memiliki selain daerah yang "conserve". Gen ini pula memiliki daerah yang sangat bervariasi sehingga menurut Yamashita<sup>5</sup> bahwa untuk isolasi gen ini tidak memiliki primer yang spesifik karena banyak ditemukan daerah yang bervariasi yang disebabkan karena adanya penyisipan asam amino pada daerah aktif gen gtf B/C. Bakteri yang memiliki gen gtf B/C adalah bakteri yang memiliki salah satu sifat kariogenik. Hal ini dibuktikan dengan banyaknya bakteri yang mampu mengekspresikan enzim glukosiltransferase dengan teramplifikasinya gen gtf B/C pada beberapa bakteri hasil isolasi yang berasal dari karies gigi.

## **Kesimpulan**

Dari penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa penggunaan teknik PCR memudahkan terdeteksinya gen gtf B/C dibuktikan dengan amplifikasi gen 16s rDNA diperoleh produk PCR dengan panjang pita 1400-an pb. Sedangkan, produk PCR dengan gen gtf B/C diperoleh panjang pita kurang dari 600 pb. Ukuran panjang ini mendekati dengan data yang ada pada gen Bank.

## **Daftar Pustaka**

1. Retnoningrum, D.S. 1997. Penerapan *Polymerase Chain Reaction (PCR)* Untuk Diagnosa Penyakit Infeksi. Jurusan Farmasi FMIPA. Bandung: ITB.

2. Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J. & Zaller, M. 1992. *Recombinant DNA*. New York: WH Freeman.
3. Satari MH. Fenomena Molekuler Hiperproduksi Enzim Betalaktamase pada *Staphilococcus aureus* Resisten terhadap Ampisilin-Sulbaktam. Bandung: Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran, Disertasi 2002.
4. Ruoff KL. *Streptococcus anginosus* (“*Streptococcus milleri*”): The Unrecognized Pathogen. *J Clin Microbiol* 1988; 1(1):102-10.
5. Yamashita Y, Bowen WH, Kuramitsu HK. Molecular analysis of a streptococcus mutans strain exhibiting polymorphism in the tandem *gtf* and *gtf* BC genes. *Infect Immun* 1992; 60(4):1618-16.
6. Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol* 2004; 3023-30.
7. Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE. Quantitative analysis of diverse lactobacillus species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7):3128-31.