

**Peran Real Time Pcr Pada Deteksi Mikroba *Severe Early Childhood Caries* (S-ECC)
(Suatu Tinjauan Artikel)**



**Eko Sri Yuni Astuti
Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Anak**

**Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Mahasaraswati Denpasar
2018**

**Peran Real Time Pcr Pada Deteksi Mikroba *Severe Early Childhood Caries (S-ECC)*
(Suatu Tinjauan Artikel)**

Eko Sri Yuni Astuti
pedo_yuni@yahoo.co.id
Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Anak
FKG Universitas Mahasaraswati Denpasar

PENDAHULUAN

Beberapa studi bidang Ilmu Kedokteran Gigi sudah menggunakan teknik PCR ataupun Real time PCR untuk mendeteksi berbagai penyakit yang mengenai jaringan lunak dan jaringan keras gigi beberapa tahun belakangan ini.

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan tehnik dibidang biologi molekuler yang mendasar untuk melacak adanya urutan DNA yang spesifik dari mikroorganisme tertentu yang dipakai sebagai sarana diagnostik dan skrining pada penderita infeksi maupun non infeksi. (Iswari)

Real-time PCR adalah metode deteksi mutasi hanya berdasarkan PCR murni, dalam hal ini tidak memerlukan teknik lanjutan, seperti elektroforesis. PCR langsung dipantau dalam tabung reaksi dan primer PCR sendiri dirancang lebih spesifik untuk sekuen tertentu atau sekuen utuh. Dengan demikian, real-time PCR hanya digunakan untuk mendeteksi mutasi yang sudah dijelaskan sebelumnya yang ditemukan oleh beberapa teknik lain. Dalam real-time PCR, fase eksponensial PCR dipantau sebagaimana mestinya menggunakan molekul berlabel fluorescen.

Karies adalah penyakit infeksi kronis yang mengenai jaringan keras gigi, dan dapat terjadi pada orang dewasa ataupun anak-anak. Karies yang menyerang anak-anak di bawah usia 71 bulan atau 5 tahun disebut ECC (*Early Childhood Caries*), dan apabila menyerang anak usia di bawah 3 tahun disebut S-ECC (*Savere Early Childhood Caries*). (Kawashita, 2011)

Prevalensi karies pada anak usia 5 tahun sebesar 67.3 %, dengan angka pengalaman karies sebesar ≥ 6 , hal ini termasuk kategori ECC yang parah (S-ECC). (Riskedas, 2018)

Sebagian besar studi klinis pada penyebab karies, focus pada bakteri streptokokus mutans (MS) dan laktobasilus (LB) yang rutin dideteksi menggunakan metode kultur selektif, (Li & Tanner, 2015 Chadna,K. et al, 2018) walaupun telah diketahui mikroorganisme pada biofilm yang

diambil pada pasien ECC terdiri dari banyak macam bakteri. Studi molekular dengan menggunakan teknik real time PCR telah memperlihatkan bahwa MS dan LB sedikit atau tidak ada, sehingga memunculkan gagasan adanya species lain yang berperan pada ECC. (Chadna,K. et al, 2018)

Tujuan dari artikel ini adalah untuk mengupas metode real time PCR (RT-PCR) untuk mengetahui beberapa mikroorganisme penyebab ECC dan S-ECC.

SCARDOVIA WIGGSIAE

Metode molekular seperti polymerase chain reaction (PCR) denaturasi gel elektroforesis telah digunakan untuk menjelaskan profil bakteri pada ECC. (Lie et al, 2007) Sebagian besar spesies yang berhubungan dengan S-ECC yang teridentifikasi, seperti *Streptococcus mutans*, *Scardovia wiggisiae*, *Parascardovia denticolens*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus sobrinus*, and *Actinomyces gerencseriae*. (Tanner et al, 2015 cit Chadna,K. et al, 2018)

S. wiggisiae terlihat secara signifikan berhubungan dengan S-ECC dalam ada dan tidaknya deteksi S M. (Tanner et al, 2011 cit Chadna,K. et al, 2018)

Chadna,K. et al, 2018 melakukan deteksi *Scardovia Wiggisiae* dari saliva anak dengan S-ECC dengan metode real time PCR (rt-PCR). Sampel 1-2 ml saliva yang tidak distimulasi dikumpulkan dari anak-anak dengan S-ECC, disimpan pada suhu -80° sampai analisis mikrobial dilakukan.

Analisa mikrobial dengan metode real time PCR untuk mendeteksi *S. wiggisiae*. Ekstraksi RNA dilakukan dengan Qiagen spin column kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA). cDNA dibuat dari RNA menggunakan reverse transcriptase. PCR untuk *S. wiggisiae* menggunakan urutan 5'-GTGGACTTTATGAATAAGC-3' dan primer reverse 5'-CTACCGTTAAGCAGTAAG-3' dari gen 16sRNA *S. wiggisiae*.

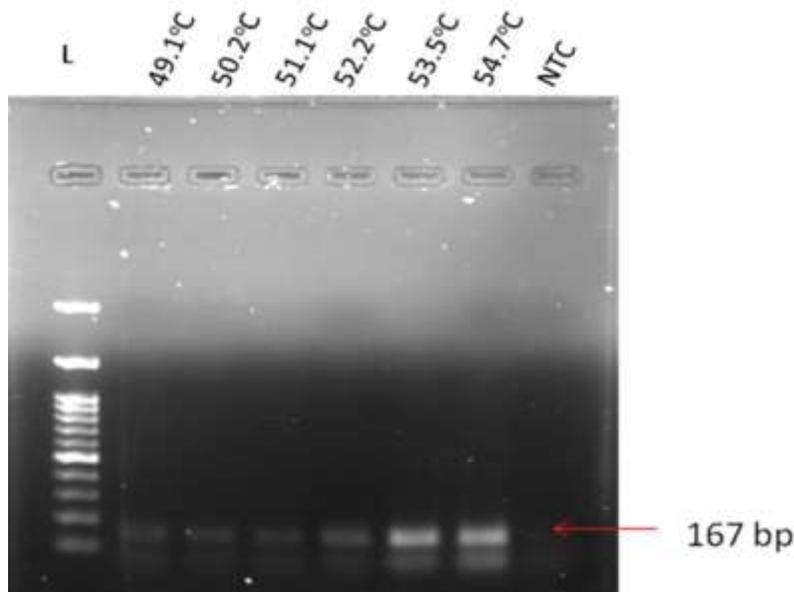
Isolasi RNA dari sampel saliva sesuai protap, dilanjutkan dengan pemberian DNase-free DNase I (*Thermo Fisher Scientific, Waltman, MA, USA*). Kurang lebih 1 μ l dari 10x buffer DNase I ditambahkan pada 8 μ l larutan yang mengandung 1,5 μ g RNA dan *nuclease free water*. Kemudian 1 μ l DNase ditambah RNA diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit, diikuti penambahan 1 μ l 25mM EDTA ke RNA dan dinkubasi pada suhu 65° C selama 10 menit. Setelah itu quantifikasi menggunakan *nanodrop spectrophotometer*.

Persiapan dari cDNA (reverse transcription), DNase yang diberikan pada RNA yang diperoleh dari sel-sel yang digunakan untuk mensintesis complementary DNA (cDNA) dengan RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltman, MA, USA) yang selanjutnya sebagai *template* untuk menganalisa amplifikasi menggunakan primer spesifik ke molekul-molekul yang berbeda. Sebanyak 20 μ l cDNA dipersiapkan dari RNA melalui beberapa tahapan.

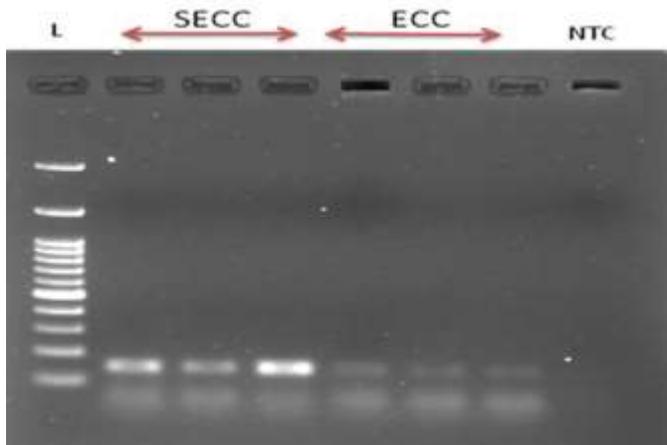
Menentukan disain primer dan standarisasi

Analisis PCR, primer didisain menggunakan software Primer3. Untuk memastikan spesifitas dari primer-primer yang terseleksi, BLAST digunakan untuk menyejajarkan primer-primer tersebut. (Sigma-Aldrich Corporation, Bengaluru, India) dengan urutan genom pada data base dan urutan spesifitas yang sudah tercek.

Temperatur *annealing* primer distandarisasi oleh PCR pada thermocycler Eppendorf 5⁰ lebih tinggi dan 5⁰ lebih rendah dari suhu melting primer. Temperature *annealing* ditemukan pada 54⁰ digunakan untuk analisis qPCR, dan diikuti oleh electrophoresis dengan gel agarose 2% untuk melihat spesifitas dan intensitas ukuran produk yang diinginkan



Hasil menunjukkan bahwa ekspresi relative m RNA dari gen 16s rRNA *S. wiggisiae* lebih tinggi pada S-ECC daripada ECC dan kontrol



Level *S. wiggsiae* pada saliva signifikan berhubungan dengan ECC pada anak, dan *S. wiggsiae* mewakili sebuah batas baru mikrobra penyebab ECC. (Chadna, K. et al, 2018)

STREPTOCOCCUS MUTANS DAN STREPTOCOCCUS SANGUINIS

Ge et al mengatakan bahwa anak yang bebas karies mempunyai kolonisasi *S. sanguinis* yang lebih tinggi daripada *S. mutans* serta menemukan interaksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* signifikan dengan terjadinya karies. (Ge et al, 2008 cit Mitrakul, K. et al, 2016) Teknik PCR telah dapat mendeteksi *S. sanguinis* pada plak awal (kurang dari 4 jam pembentukan) anak – anak Thailand umur 1-6 tahun dengan ECC.

Mitrakul, K. et al, 2016 melakukan studi untuk mendeteksi *S. sanguinis* dan *S. mutans* pada plak yang terbentuk setelah 4 jam (plak awal) dan plak setelah terbentuk semalam (plak matang) dengan menggunakan teknik real time PCR dari anak-anak Thailand usia 2-6 tahun dengan ECC dan bebas karies.

Tahapan yang dilakukan adalah, sampel plak dari permukaan bukokubukal dimasukkan pada 1 ml buffer TE dan disimpan pada suhu -20° C sebelum proses ekstraksi DNA.

Ekstraksi DNA berdasarkan *enzymatic lysis* dengan kit yang dijual bebas (Flavogen, Taiwan) pada strain *S. mutans* ATCC 25175 dan *S. sanguinis* OMZ 2176 yang telah dikultur semalam dengan *Brain Heart Infusion agar and broth* melalui beberapa tahapan protap ekstraksi DNA. Pengukuran konsentrasi dan kemurnian ekstraksi DNA dengan spectrophotometer at 260nm/280nm (Nanodrop 2000C® Thermo Scientific, Delaware, USA).

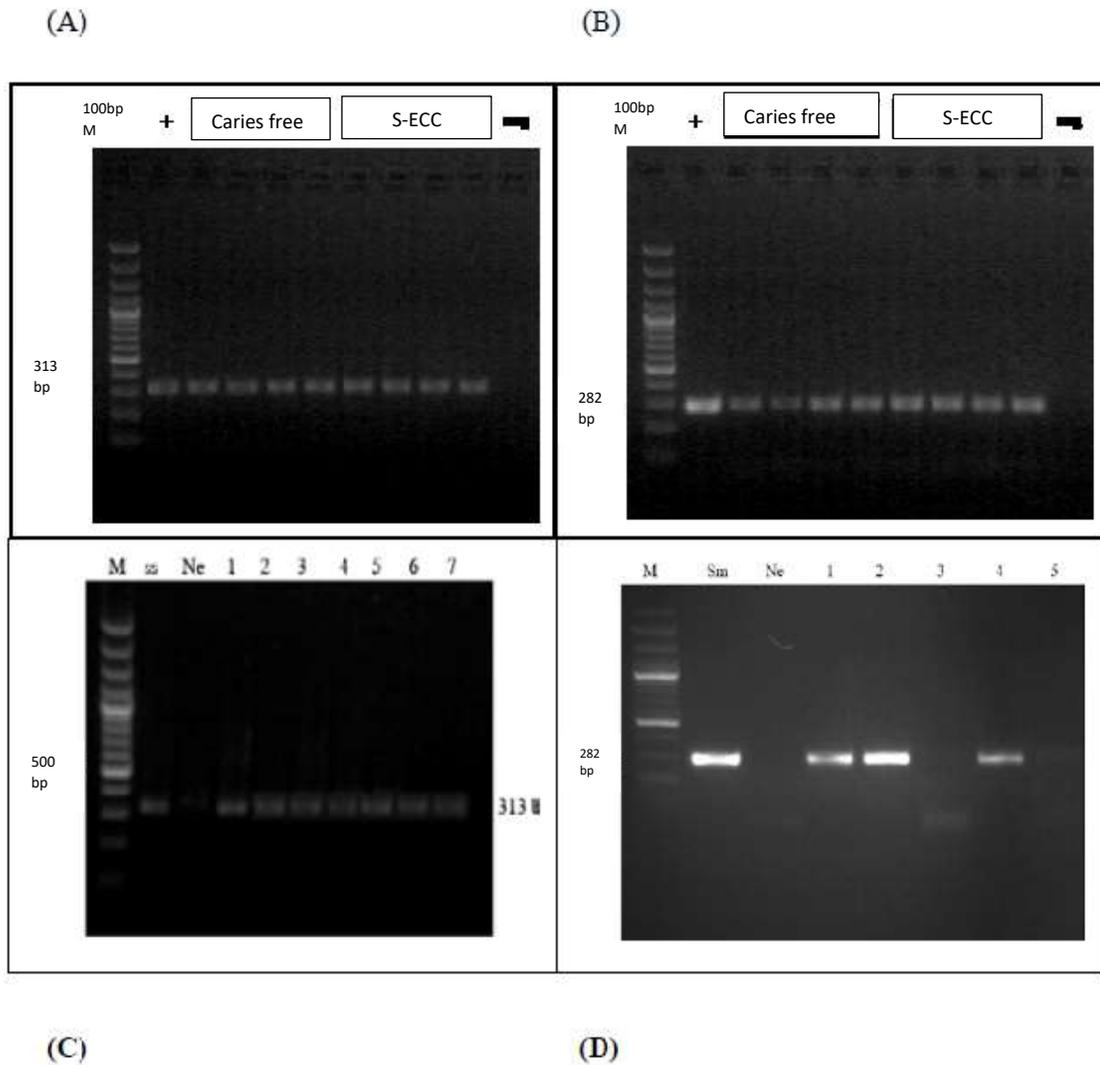
Konvensional PCR dilakukan untuk semua sampel ekstraksi DNA dengan mengkonfirmasi *16srRNA universal primers* (27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')

Real time PCR dari *S. mutans* dan *S. sanguinis* dilakukan dengan primer spesifik, yaitu :
S. sanguinis MKP-F: 5'-GGATAGTGGCTCAGGGCAGCCAGTT-3',
MKP-R : 5' GAACAGTTGCTGGACTTGCTTGTC-3',
S. mutans Sm1: 5'-GGTCAGGAAAGTCTGGAGTAAAAGGCTT-3',
Sm2: 5'-GCGGTAGCTCCGGCACTAAGCC-3')

dengan standar pengenceran 10 kali. (Sato et al, 2003)

Reaksi pencampuran sesuai protap, reaksi untuk DNA sampel plak dari sampel-sampel plak adalah sama untuk strain standard. Maset thermocycler (C1000™ Thermal cycler and CFX 96 Real-time System) untuk 40 siklus. Masing-masing siklus meliputi aktivasi enzim 95⁰ C selama 3 menit, denaturasi pada 95⁰ C selama 3 detik, annealing pada 61.5⁰ C selama 30 detik dan extension pada 60⁰ C selama 20 detik untuk *S. sanguinis* dan *S. mutans*. Kurva melting dirata-rata dari 60⁰C sampai 95⁰C dan setiap 0.5⁰C selama 5 detik

Amplifikasi produk PCR dari PCR konvensional dicek menggunakan gel agarose 2% dan real time PCR dengan gel agarose 1.5% (Broad Separation Range for DNA/RNA agarose, Fisher Scientific, UK). Hasil gambar *dicapture* menggunakan sistem gambar digital (Molecular Imager ®Gel doc™ Systems, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA).



Elektrophoresis gel agarose real time PCR dari produk plak matang menggunakan primer spesifik (A) *S. sanguinis* dan (B) *S. mutans*. Jalur 1: 100 bp *molecular marker* (Geneaid Biotech Ltd, Taiwan), Jalur 2 : Kontrol positif, Jalur 3-6 : sampel bebas karies, Jalur 7-10 : sampel S-ECC; Jalur 11 : Kontrol Negatif dan plak awal menggunakan primer spesifik dari (C) *S. sanguinis*, Jalur 1: 100 bp marker, Jalur 2: Kontrol positif, Jalur 3: Kontrol Negatif, Jalur 4-10: *S. sanguinis* sampel positif DNA dan (D) *S. mutans*, Jalur 1: 100 bp marker, Jalur 2: Kontrol positif, Jalur 3: Kontrol negatif, Jalur 4-5,7: *S. mutans* sampel positif DNA, Lane 6,8: *S. mutans* sampel negative DNA

Studi ini yang pertama menjelaskan tentang jumlah *S. sanguinis* dan *S. mutans* pada dua tahap berbeda pembentukan plak (plak awal dan plak matang) menggunakan real time PCR. Pada

plak awal, *S. sanguinis* lebih tinggi pada bebas karies. Pada plak matang, *S. mutans* dan ratio *S. mutans/S. sanguinis* tinggi pada S-ECC. Hal ini bermanfaat untuk menggunakan ratio *S. mutans/S. sanguinis* sebagai salah satu indikator resiko S-ECC.

RINGKASAN

1. Real time PCR dapat digunakan untuk mendeteksi **Scardovia Wiggsiae** yang mewakili mikroba *a new frontier* penyebab *Severe Early Childhood Caries* (S-ECC)
2. Real time PCR dapat mendeteksi ratio **S. mutans/ S. sanguis** pada plak gigi, dan dapat digunakan untuk menilai indikator resiko terjadinya S-ECC

REFERENSI

1. Berkowitz, R. J. 2003. Causes, Treatment and Prevention of Early Childhood Caries: A Microbiologic Perspective, *J Can Dent Assoc*; 69(5):304–7
2. Chandna, P., Srivastava, N., Sharma¹, A., Sharma, V., Gupta, N., Adlakha, V.K. 2018. Isolation of *Scardovia wiggisiae* using real-time polymerase chain reaction from the saliva of children with early childhood caries, *J Indian Soc Pedod Prev Dent*;36:290-5.
3. Iswari, S.I., Teknologi DNA Rekombinan (*Recombinant Dna Technology*), RSUP Sanglah, Denpasar-Bali Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
4. Kawashita, Y. Kitamura, M., Saito, T. 2011. Early Childhood Caries. *International Journal of Dentistry.*, Article ID 725320, 7 pages
5. Li Y, Ge Y, Saxena D, Caufield PW. 2007. Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early-childhood caries. *J Clin Microbiol*;45:81-7.
6. Mitrakul, K., Vongsawan, K., Sriutai, A, Thosathan,W. 2016. Association between *S. mutans* and *S. sanguinis* in Severe Early childhood Caries and Caries-Free ChildrenA Quantitative Real-Time PCR Analysis. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*; 40(4):281-289
7. Riskesdas 2018, Prevalensi Karies Dan Rata-Rata Karies Anak-Anak, Kementerian Kesehatan RI
8. Sato T, Matsuyama J, Kumagai T, Mayanagi G, Yamaura M, Washio J, et al. 2003. Nested PCR for detection of mutans streptococci in dental plaque. *Lett Appl Microbiol*; 37(1): 66-9.

