

## Review Artikel: Teknik -Teknik Analisis Profil Mikrobiota Penyebab Karies

*Article Review: Microbiota Causing Caries Profile Analysis Techniques*

**Sukaeni Ibrahim<sup>1</sup>, Marhaen Hardjo<sup>2</sup>**

\*Email: ibrahimsukaeni@gmail.com

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Bosowa

<sup>2</sup>Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin

Diterima: 12 September 2022 / Disetujui: 30 Desember 2022

### ABSTRAK

Karies gigi merupakan penyakit infeksi kronis yang umum terjadi akibat bakteri kariogenik yang melekat pada gigi. Mikroorganisme kariogenik berperan penting dalam perkembangan karies. *Streptococcus mutan* merupakan mikroorganisme patogen penting dalam perkembangan lesi karies. Perkembangan terbaru dalam teknologi sekuensing DNA belakangan ini telah memungkinkan untuk memetakan profil komposisi mikrobioma rongga mulut dan memberikan harapan dalam menyelesaikan penyakit menular ini. Pada penelitian ini, kami mengumpulkan data penelitian mengenai teknik analisis profil mikrobioma rongga mulut melalui mesin pencarian online *Google Scholar* dan *Pubmed*. Dan didapatkan 15 jurnal yang membahas mengenai teknik identifikasi mikrobioma rongga mulut. Teknik analisis mikrobioma rongga mulut dapat diketahui dengan jelas beserta kelebihan dan kekurangan untuk merancang penelitian lebih lanjut tentang mikrobioma penyebab terjadinya karies.

**Kata Kunci:** Mikrobioma Rongga Mulut, Karies, Teknik Analisis

### ABSTRACT

*Dental caries is a common chronic infectious resulting from tooth adherent cariogenic bacteria. The cariogenic microorganisms play an important part in caries development. Streptococcus mutan is an important pathogenic organism in the development of caries lesion. The development of dental caries is highly associated with the microbiota in the oral cavity. Recent developments in DNA sequencing technology have made it possible to map the compositional profile of the oral microbiome and provide hope in solving the problem on this infectious disease. The development of dental caries is closely related to the microbiota in the oral cavity. Recent developments in DNA sequencing technology have made it possible to map the compositional profile of the oral microbiome and provide hope in solving this infectious disease problem. Methode: In this study, we collected research data regarding the technique of analyzing oral microbiome profiles through the online search engines Google Scholar and Pubmed. And obtained 15 journal that discuss the identification technique of the oral microbiome Result: The oral microbiome analysis technique can be identified clearly along with its advantages and disadvantages for design further research on the microbiome that causes caries.*

**Keywords:** Oral Microbiome , Caries, Analysis Technique



This work is licensed under Creative Commons Attribution License 4.0 CC-BY International license

### A. PENDAHULUAN

Karies adalah suatu penyakit kronik terbanyak yang dijumpai pada pasien anak. Penyakit ini tidak hanya mempengaruhi kondisi kesehatan, namun

dapat juga berdampak kepada perkembangan kemampuan kognisi dan kesehatan mental anak selama masa pertumbuhan. Meskipun dapat dihindari dengan melakukan pencegahan dini, penyakit ini dialami oleh

54% anak kelompok usia 5-9 tahun di Indonesia (Amalia *et al*, 2019). Penyakit ini memiliki risiko rekurensi yang tinggi meskipun dilakukan intervensi farmakologis seperti antibiotik dan edukasi untuk mengubah pola makanan setelah pencabutan atau dengan restorasi karies (Balolong & Mendoza, 2020). Oleh karena itu, sangat penting untuk mengetahui dasar pathogenesis dari penyakit ini.

Karies diketahui terjadi akibat etiologi yang bersifat multifaktorial. Hipotesis plak nonspesifik menyebutkan bahwa karies gigi terbentuk akibat konsumsi gula dalam kurun waktu lama memicu spesies bakteri penghasil asam dalam rongga mulut memetabolisir gula menyebabkan terjadinya demineralisasi dari jaringan keras gigi dan membentuk suatu plak karies. Sedangkan hipotesis spesifik menyebutkan bahwa suatu bakteri spesifik, seperti *Streptococcus mutans*, merupakan kunci dari faktor patologis pembentukan karies. Perdebatan antara ahli ini disebabkan oleh kurang berkembangnya penelitian etiologi karies gigi. Hal ini disebabkan karena kompleksitas dari plak gigi yang berjumlah kurang lebih 700 spesies beserta interaksi antara komunitas bakteri. Sehingga, penelitian etiologi saat ini berpusat pada profil mikrobioma karies dan hubungannya beserta

faktor genetik dari penderita (Berkowitz *et al* 2011).

Perkembangan teknologi metagenomik dan sequencing DNA belakangan ini memungkinkan untuk menganalisis secara langsung seluruh komposisi spesies dan gen yang berkaitan erat dengan pembentukan karies gigi. Sehingga, terdapat peningkatan suara para ahli yang menyimpulkan pembentukan karies gigi. Karies disebabkan bukan hanya oleh faktor spesies spesifik, melainkan juga oleh suatu faktor eksternal. Ketidakseimbangan mikrobioma dan disbiosis dari struktur ekologis sistem mikrobioma mulut akibat faktor eksternal diperkirakan menjadi penyebab terjadinya plak karies. Ketidakseimbangan ini dipengaruhi tidak hanya oleh satu jenis spesies spesifik tertentu, melainkan oleh beberapa komunitas spesies bakteri. Hingga saat ini, terdapat beberapa teknik identifikasi komposisi, struktur dan informasi lengkap mengenai seluruh mikroorganisme dalam plak biofilm rongga mulut dengan kelebihan dan kekurangan masing masing (Cullen *et al*, 2020). Namun, hasil penelitian dari teknik tersebut diatas masih sangat bervariasi. Oleh karena itu, penting mengetahui teknik teknik identifikasi beserta kelebihan dan kekurangan sebelum merancang penelitian mikrobioma rongga mulut.

Penelitian ini bertujuan untuk meninjau ulang beberapa penelitian terakhir yang mendeskripsikan teknik analisis jenis spesies mikroorganisme rongga mulut yang bertanggung jawab dalam pembentukan karies gigi.

## B. METODE PENELITIAN

Desain penelitian ini adalah *literature review* atau tinjauan pustaka. Kami mengumpulkan data penelitian mengenai teknik analisis profil mikrobioma rongga mulut melalui mesin pencarian online Google Scholar dan Pubmed pada tanggal 8 November 2022. Kami mendapatkan 14 jurnal yang membahas mengenai teknik identifikasi mikrobioma rongga mulut yang berkaitan dengan tema literatur review ini

## C. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Komposisi Mikrobioma Oral:

Istilah "mikrobioma oral" diciptakan untuk menggambarkan komunitas mikroba yang menghuni rongga mulut dan berperan dalam modulasi berbagai kondisi patofisiologi pada tubuh manusia. Dibandingkan dengan bagian tubuh lainnya, mikrobioma rongga mulut bersifat khas dan mudah diakses. Namun, hanya ada sekitar 700 taksa yang dominan: 54% dapat dikultur dan diidentifikasi; 14% dapat dikultur tetapi belum dapat diidentifikasi, dan 32% sisanya belum dapat dikultur. Perkiraan ini didasari oleh identifikasi tradisional bakteri selama

bertahun-tahun melalui studi karakterisasi kultur dan fenotipik (Do *et al*, 2021).

Penelitian mikrobioma saat ini berada pada tahap modern. Banyak penelitian sedang dilakukan, dan data bertambah terus menerus, hingga saat ini dengan total 392 taksa yang memiliki setidaknya satu genom referensi dan mendekati total 1500 genom dalam rongga mulut. Namun, hasil yang diperoleh dari berbagai penelitian tidak konsisten. Hal ini mungkin terjadi karena teknik yang digunakan, standarisasi metode, ukuran sampel, dan lain lainnya masih bersifat variatif. Penelitian dengan ukuran sampel yang lebih besar dengan lokasi berbeda diperlukan untuk dapat dikembangkan pola yang konsisten agar menghasilkan data yang lebih konkret (Choubey *et al*, 2021).

Bakteri utama yang ditemukan dalam rongga mulut yang sehat adalah sebagai berikut: Gram Positif: *Cocci-Abiotrophia*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Stomatococcus Batang* - *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Pseudoramibacter*, *Rothia*. Dan Gram Negatif: *Cocci* - *Moraxella*, *Neisseria*, *Veillonella Batang*- *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Desulfobacter*, *Desulfovibrio*, *Eikenella*, *Fusobacterium*, *Hemophilus*, *Leptotrichia*,

*Prevotella*, *Seimonas*, *Simonsiella*, *Treponema*, *Wolinella*. Sedangkan dalam rongga mulut yang terdapat karies ditemukan ditemukan *Streptococcus mutans* dan *Lactobacillus acidophilus* dalam jumlah yang banyak (Jaksik *et al*, 2015).

## 2. Fungsi Mikrobioma Rongga Mulut

Komunitas mikroba yang ada dalam tubuh manusia berperan dalam fungsi kritis, fisiologis, metabolisme dan imunologis meliputi pencernaan makanan dan nutrisi; generasi energi, diferensiasi dan pematangan mukosa inang dan sistem kekebalannya; kontrol penyimpanan lemak dan regulasi metabolisme; pengolahan dan detoksifikasi bahan kimia lingkungan; fungsi penghalang kulit dan mukosa; pemeliharaan sistem kekebalan tubuh dan keseimbangan antara proses pro-inflamasi dan anti-inflamasi; mempromosikan mikroorganisme (resistensi kolonisasi) dan pencegahan invasi dan pertumbuhan penyakit (Jaksik *et al*, 2015).

Fisiologi dan ekologi mikrobioma rongga mulut berkaitan erat dengan inang baik pada skala mikron maupun skala inang (manusia). Mikrobioma rongga mulut biasanya ada dalam bentuk biofilm. Hal ini memainkan peran penting dalam menjaga homeostasis mulut, melindungi rongga mulut, dan mencegah perkembangan penyakit. Mengetahui identitas mikrobioma dan aspek yang biasa berinteraksi dengan

mereka diperlukan untuk pemahaman mekanistik dari kunci utama (Jaksik *et al*, 2015).

## 3. Metode Pembelajaran Mikrobioma Rongga Mulut

Karena sampel mudah diperoleh, mikrobioma rongga mulut dapat dikatakan sebagai mikrobioma manusia yang baik untuk dipelajari hingga saat ini. Metode tradisional untuk identifikasi mikroba adalah metode kultur dari satu spesies menjadi komunitas multispesies *in vitro* yang kompleks. Pada beberapa tahun terakhir, terjadi kemajuan besar dalam pengembangan teknik "omics" kultur-independen. Metode ini mempelajari DNA, RNA, protein atau metabolik dari seluruh komunitas mikroba.

Mikrobioma dan metagenomic merupakan dua bidang penelitian yang muncul untuk mendeteksi dan mengidentifikasi keberadaan mikroba dan memahami sifat aktivitas mikroba pada kondisi sehat dan sakit. Metagenomic adalah suatu teknik identifikasi bakteri yang tidak dapat dibiakkan. Metode ini juga dapat mengidentifikasi keragaman genomik mikroba dengan menerapkan kekuatan analisis genomik ke seluruh komunitas mikroba. Metagenomics memberikan informasi tidak hanya tentang jenis organisme yang ada, tetapi juga potensi fungsionalnya melalui analisis gen dan jalur

metabolisme. Selain itu juga dapat memberikan informasi tentang penggunaan database urutan pengkodean protein, mengurutkan seluruh DNA dari sampel yang diteliti (Jian *et al*, 2020).

a) Kultur dan mikroskop

Metode kultur dan mikroskop merupakan metode konvensional yang telah digunakan sejak lama dalam mengidentifikasi taksa bakteri dan menganalisis komposisi mikrobioma rongga mulut melalui metode seperti kultur bakteri, uji enzimatik, sensitivitas antibiotik, dan immunoassays. Namun pada teknik ini, Sebagian besar bakteri rongga mulut bertumbuh lambat, membutuhkan media pertumbuhan yang kompleks, persyaratan tekanan atmosfer yang sangat spesifik dan waktu inkubasi yang lama. Mayoritas bakteri rongga mulut merupakan bakteri anaerob sehingga pengumpulan sampel harus dilakukan oleh tenaga ahli, transportasi dan inkubasi yang ketat untuk mencegah paparan oksigen. Media selektif telah terbukti berguna untuk mempelajari spesies tertentu yang diinginkan, akan tetapi mungkin dapat membiaskan pemahaman akan etiologi karies, bila dihubungkan dengan karakteristik penyakit karies dengan spesies yang tumbuh subur di bawah kondisi kultur. sementara spesies lain tidak terdeteksi. Namun, 31% dari taksa rongga mulut yang

diketahui masih tidak dapat ditumbuhkan secara *in vitro*, sehingga metode konvensional seperti kultur bakteri masih penting dalam mikrobiologi (Ibrahim *et al*, 2009).

b) Teknik berbasis gel

Pada beberapa teknik kultur-independen komunitas mikroba sudah dapat dilakukan analisis *throughput* tinggi. Terdapat dua jenis teknik berbeda yang digunakan yaitu *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) dan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RELP) (Ibrahim *et al*, 2009).

Kelebihan teknik DGGE dan RELP adalah reliabilitas, reproduktifitas, kecepatan, dan biaya rendah. Karena beberapa sampel dapat dianalisis secara bersamaan, pelacakan perubahan populasi mikroba sebagai respons terhadap rangsangan atau kesulitan apa pun dapat diperoleh dengan teknik DGGE dan RELP. Keterbatasan teknik DGGE dan RELP termasuk bias dari PCR, penanganan sampel yang melelahkan, dan efisiensi ekstraksi DNA yang bervariasi. Diperkirakan teknik DGGE dan RELP hanya dapat mendeteksi 1% -2% dari populasi mikroba yang mewakili spesies dominan yang ada dalam sampel (Krishnan *et al*, 2017).

c) Metode berbasis Quantitative Polymerase Chain Reaction

Pendekatan PCR kuantitatif (Q-PCR atau *real-time* PCR) sekarang banyak diterapkan pada penelitian ekologi mikroba untuk mengukur jumlah dan ekspresi penanda gen taksonomi dan fungsional dalam sampel. Analisis berbasis Q-PCR menggabungkan PCR deteksi titik akhir 'konvensional' dengan teknologi deteksi fluoresen guna merekam akumulasi amplicon secara *real time* selama setiap siklus amplifikasi PCR. Perbandingan kuantifikasi jumlah gen (atau transkripsi) saat ini dengan konsentrasi template awal dapat diketahui dengan mendeteksi amplicon selama fase eksponensial awal PCR (Martín *et al.* 2014).

Q-PCR telah terbukti menjadi metode yang akurat, sangat mudah direproduksi dan sensitif secara kuantitatif untuk melacak perubahan filogenetik dan fungsional gen. Selain itu, data kuantitatif yang dihasilkan dapat digunakan untuk menghubungkan variasi dalam jumlah gen dan /atau tingkat ekspresi gen (dalam hal jumlah transkrip) dibandingkan dengan variasi faktor abiotik atau biotik dan/atau aktivitas biologis. Ketersediaan set data Q-PCR dapat menggambarkan jumlah bakteri atau gen tertentu sehingga dapat melengkapi set data kuantitatif lainnya. Hal ini sangat penting dalam identifikasi ekologi mikroba karena

menambah pemahaman akan peran dan kontribusi kelompok mikroba tertentu dalam ekosistem. Selanjutnya, analisis transkripsi balik (RT) apabila dikombinasikan dengan metode Q-PCR dalam pengujian RT-Q-PCR, semakin menjadi alat yang ampuh untuk mengukur ekspresi gen (dalam hal jumlah transkrip rRNA dan mRNA) dan menghubungkan aktivitas biologis dengan fungsi ekologi (Martín *et al.* 2014).

d) Mikroarray DNA

Dalam komunitas ilmiah, filogenetik DNA mikro-array telah dikenal sebagai alat dengan hasil analisis yang tinggi dan sistematis dengan kuantitatif komunitas bakteri dalam ekosistem mikroba yang berbeda termasuk mikrobiota rongga mulut. Analisis microarray DNA menjadi teknik yang ampuh untuk mengidentifikasi gen yang diekspresikan secara berbeda, tetapi dalam membedakan *varian splice* dapat menjadi permasalahan (Rizal *et al.* 2020).

Kelemahan yang paling utama dari microarray adalah biaya tinggi untuk percobaan tunggal, kurangnya kontrol atas kumpulan transkrip karena sebagian besar platform microarray hanya menggunakan satu set probe yang dirancang dari pabrik. Kelemahan lain dari microarray adalah akurasi, presisi dan spesifisitas yang relatif rendah serta sensitivitas tinggi untuk pengaturan eksperimental variasi suhu

hibridisasi, kemurnian dan tingkat degradasi materi genetik, dan proses amplifikasi yang dilakukan bersama dengan faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi perkiraan ekspresi gen (Rizal *et al.* 2020).

e) 16S rRNA Sequencing

Pendekatan sekuensing DNA dasar telah banyak diterapkan untuk mempelajari komunitas mikroba rongga mulut adalah analisis sekuens 16S rRNA. Dengan metode ini memungkinkan (1) sekuensing pada hampir semua bakteri, kadang sebagai family yang multigen; (2) Fungsi gen 16S rRNA tidak berubah dari waktu ke waktu, yang menunjukkan bahwa perubahan acak dalam urutan merupakan ukuran waktu yang lebih tepat (evolusi) dan (3) gen 16S rRNA (1500 bp) cukup besar untuk tujuan informatika. Dengan metode ini gen menjadi sangat terkonservasi, dengan referensi yang cenderung tidak berbeda dari gen pada bakteri yang terkumpul pada sampel. Namun, urutan 16S rRNA hanya menentukan keberadaan atau jumlah spesies bakteri (Rosier *et al.*, 2014).

f) Teknik Next Generation Sequencing (NGS)

Teknik sekuensing generasi berikutnya telah merevolusi studi keanekaragaman mikroba dalam dekade terakhir. Teknik ini memungkinkan proyek pengurutan skala besar dapat diselesaikan dalam beberapa hari atau bahkan dalam hitungan jam. Untuk

interpretasi yang bermakna, analisis NGS membutuhkan kemampuan bio-informatika ekstensif yang melibatkan kontrol kualitas data, penyelarasan dan pemetaan ke genom referensi yang baik, penyaringan untuk pembacaan berkualitas baik, menghilangkan chimera dan mendukung normalisasi di seluruh sampel dan populasi. Teknologi NGS utama adalah sebagai berikut:

- 454 pirosequencing
- Biosistem Terapan
- illumina
- Biosains Pasifik
- Oxford Nanopori.

Dengan alat-alat ini, memungkinkan bagi para peneliti untuk membuat profil mikrobioma dan metagenom yang belum pernah terjadi sebelumnya. Hasil luaran yang tinggi dan fakta bahwa taksa tertentu tidak perlu ditargetkan adalah kelebihan utama teknik NGS (Yang *et al.*, 2012)

#### D. KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwakaries merupakan penyakit rongga mulut yang infeksius dan sekaligus penyakit yang bisa dicegah. Penyebab terjadinya karies dikarenakan oleh sejumlah microbiota rongga mulut. Mikrobiota rongga mulut merupakan hal selalu menarik perhatian peneliti untuk digali lebih dalam dan sudah berkembang pesat. Terdapat beberapa teknik analisis mikrobiota rongga mulut seperti

teknik kultur dan mikroskop, teknik dengan berbasis gel, metode reaksi berantai polymerase, microarray DNA, 16S rRNA sequencing, dan teknik sequencing generasi berikutnya. Saat ini teknik yang paling baik digunakan adalah Next Generation Sequencing (NGS).

## DAFTAR PUSTAKA

- Amalia R, Chairunisa F, Alfian MF, Supartinah A. (2019). Indonesia: Epidemiological Profiles of Early Childhood Caries. *Front Public Health*, 6,7, 210. doi: 10.3389/fpubh.2019.00210. PMID: 31448251; PMCID: PMC6691044.
- Balolong, M. P., & Mendoza, M. A. F. (2020). Understanding Oral Diseases: Exploring Opportunities from Filipino Oral Microbiome Research. In (Ed.), *Dental Caries*. IntechOpen.
- Berkowitz RJ, Amante A, Kopycka-Kedzierawski DT, Billings RJ, Feng C. (2011). Dental caries recurrence following clinical treatment for severe early childhood caries. *Pediatr Dent*, 33(7):510-4. PMID: 22353412.
- Cullen CM, Aneja KK, Beyhan S, Cho CE, Woloszynek S, Convertino M, McCoy SJ, Zhang Y, Anderson MZ, Alvarez-Ponce D, Smirnova E, Karstens L, Dorrestein PC, Li H, Sen Gupta A, Cheung K, Powers JG, Zhao Z, Rosen GL. (2020). Emerging Priorities for Microbiome Research. *Front Microbiol*, 19;11:136. doi: 10.3389/fmicb.2020.00136. PMID: 32140140; PMCID: PMC7042322.
- Do T, Dame-Teixeira N, Deng D. (2021). Editorial: Applications of Next Generation Sequencing (NGS) Technologies to Decipher the Oral Microbiome in Systemic Health and Disease. *Front Cell Infect Microbiol*, 22;11:801122. doi: 10.3389/fcimb.2021.801122. PMID: 35004359; PMCID: PMC8727447.
- Ibrahim S, Nishimura M, Matsumura S, Rodis O.M.M, Nishida A, Kariya N, Yamanaka K, Shimono T. (2009). Microbial screening of cariostat-inoculated plaque samples from low and high caries risk (vol. 19, pp: 181-186). *Dental Journal*.
- J. Choubey, J.K. Choudhari, B.P. Sahariah, M.K. Verma, A. Banerjee. (2021) Chapter 25 - Molecular Tools: Advance Approaches to Analyze Diversity of Microbial Community. (pp:507-520). Elsevier.
- Jaksik R, Iwanaszko M, Rzeszowska Wolny J, Kimmel M. (2015). Microarray experiments and factors which affect their reliability. *Biol Direct*, doi: 10.1186/s13062-015-0077-2. PMID: 26335588; PMCID: PMC4559324.
- Jian C, Luukkonen P, Yki-Järvinen H, Salonen A, Korpela K. (2020). Quantitative PCR provides a simple and accessible method for quantitative microbiota profiling. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0227285. PMID: 31940382; PMCID: PMC6961887.
- Krishnan K, Chen T, Paster BJ. (2017). A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis*, doi: 10.1111/odi.12509
- Martín R, Miquel S, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. (2014). The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. *Virulence*, doi: 10.4161/viru.27864.
- Muhamad Rizal NS, Neoh HM, Ramli R, A/L K Periyasamy PR, Hanafiah A, Abdul Samat MN, Tan TL, Wong KK, Nathan S, Chieng S, Saw SH, Khor BY. (2020). Advantages and Limitations of 16S rRNA Next-Generation Sequencing for Pathogen Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory: Perspectives from a Middle-Income Country. *Diagnostics (Basel)*, doi: 10.3390/diagnostics10100816. PMID: 33066371; PMCID: PMC7602188.
- Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP. (2014). Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet?. *Front Cell Infect Microbiol*, doi: 10.3390/diagnostics10100816. PMID: 33066371; PMCID: PMC7602188.
- Yang, F., Zeng, X., Ning, K. *et al* (2012). Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME J* 6, 1–10