

ANALISIS MORFOLOGI KOLONI DAN KERAGAMAN GENOTIP *STREPTOCOCCUS SANGUINIS* YANG BERASAL DARI PLAK GIGI DAN SALIVA PENDERITA PENYAKIT JANTUNG KORONER

(ANALYSIS OF COLONY MORPHOLOGY AND GENOTYPE DIVERSITY OF *STREPTOCOCCUS SANGUINIS* FROM THE DENTAL PLAQUE AND SALIVA OF CORONARY HEART DISEASE PATIENTS)

Yulianti Kemal*, Robert Lesang*, Natalina*, Boy Muchlis Bachtiar**, Lukman Hakim Makmun***

*Departemen Periodonsia

**Departemen Biologi Oral

***Departemen Penyakit Dalam RS Ciptomangunkusumo

Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia

Jl. Salemba Raya no 4 Jakarta Pusat 10430

E-mail: yulianti.soewondo@yahoo.com

Abstract

The previous study showed that the accumulation of supragingival calculus in coronary heart disease (CHD) patients grew faster and higher than that of in non CHD patients. *Streptococcus sanguinis* is recognized not only for its association with dental calculus, but also with life-threatening bacterial endocarditis. This preliminary study aimed to identify *S. sanguinis* collected from dental plaque and saliva of CHD patients. The dental plaque and saliva samples from 17 CHD patients were each dispersed onto Mitis Salivarius Agar and incubated in microaerophilic condition. A total of 50 colonies, 35 from dental plaque, 15 from saliva, presumed to be *S. sanguinis* on the basis of firm, adherent, and star shaped colony morphology, were selected and confirmed by regrowing each bacteria in nutrient blood agar. Furthermore, the bacterial chromosomal DNA was extracted and confirmed to be *S. Sanguinis* by PCR-primers with specific amplification of intergenic region (475-bp) and reference strain of *S. sanguinis* ATCC 10556; the genotype diversity was observed by OPA 2 primers. Four out of 50 isolates (8%), 1 colony from the saliva, and 3 colonies from the dental plaque confirmed to be *S. sanguinis*. In conclusion, colony morphology of *S. sanguinis* is firm, adherent, and star shaped; they are four genotype diversities of *S. sanguinis* found in the dental plaque and the saliva of CHD patients.

Key words: *Streptococcus sanguinis*, colony morphology, coronary heart

Abstrak

Penelitian sebelumnya menunjukkan akumulasi kalkulus supragingiva pada pasien dengan Penyakit Jantung Koroner (PJK) terbentuk lebih cepat dan lebih banyak dibandingkan pasien non PJK. *Streptococcus sanguinis* dikenal bukan saja dalam hubungannya dengan pembentukan karang gigi, tetapi juga dengan endokarditis bakterial yang dapat menimbulkan kematian. Penelitian awal ini bertujuan untuk mengidentifikasi *S. sanguinis* yang berasal dari plak gigi dan saliva pasien PJK. Sampel berasal dari plak gigi dan saliva 17 pasien PJK yang disebar pada plat Agar Mitis Salivarius dan diinkubasi dalam suasana mikroaerofilik. Total sampel adalah 50,35 berasal plak gigi, 15 dari saliva, yang diasumsikan sebagai *S. sanguinis* atas dasar morfologi koloninya yang jelas, lekat, berbentuk bintang, diambil dan dikonfirmasi dengan cara menumbuhkan setiap koloni kedalam agar darah bernutrisi. *Bacterial chromosomal DNA* diekstraksi dan dikonfirmasi sebagai *S. sanguinis* dengan menggunakan primer PCR amplifikasi spesifik regio intergenik (475-bp) dan strain standard *S. sanguinis* ATCC 10556. Diversiti genotip diobservasi menggunakan primer OPA2. Didapatkan 4 dari 50 isolat (8%), 1 koloni dari saliva, dan 3 koloni dari plak gigi dikonfirmasi sebagai *S. sanguinis*. Sebagai kesimpulan, morfologi koloni *S. sanguinis* jelas, lekat, berbentuk bintang, didapatkan 4 keragaman genotip *S. sanguinis* di dalam plak gigi dan saliva pasien PJK.

Kata kunci: *Streptococcus sanguinis*, morfologi koloni, jantung koroner

PENDAHULUAN

Penyakit jantung koroner (PJK) adalah penyakit jantung yang disebabkan oleh aterosklerosis atau obstruksi arteri koroner oleh plak ateromateus.¹ Infark miokardial sebagai urutan pertama penyebab kematian, umumnya disebabkan oleh penyakit jantung koroner.²

Streptococcus sanguinis adalah salah satu mikroorganisme yang umum ditemukan dalam rongga mulut, dan diketahui sebagai komponen utama plak gigi, yaitu deposit lunak pada permukaan gigi yang berasal dari glikoprotein saliva yang telah ditumbuhi berbagai macam mikroorganisme, dan oleh para ahli telah ditetapkan sebagai penyebab utama penyakit jaringan penyangga gigi, atau penyakit periodontal.^{3,4} *Streptococcus sanguinis* melalui kolonisasinya pada permukaan gigi dianggap mempunyai kemampuan agregasi yang tinggi dengan bakteri lain, sehingga mempunyai peranan penting dalam proses maturasi plak pada permukaan gigi, juga proses kalsifikasi plak menjadi kalkulus atau karang gigi. Selain itu, *Streptococcus sanguinis* banyak dikaitkan dengan kelainan jantung.^{5,6} Penelitian Kemal dan kawan-kawan pada penderita Diabetes mellitus tipe II membuktikan bahwa akumulasi kalkulus supra-gingiva pada daerah lingual regio anterior bawah pada penderita penyakit jantung koroner (PJK) lebih tinggi dibandingkan non PJK.⁷ Sejumlah peneliti mendapatkan kasus endokarditis pada pasien-pasien dengan *S. sanguinis* yang resisten terhadap penisilin⁸, kelompok peneliti lain mendapatkan *S. sanguinis* sering ditemukan pada isolasi yang berasal dari pasien-pasien endokarditis.^{9,10} Pada beberapa penelitian yang membandingkan jumlah *S. sanguinis* pada penderita PJK dan non PJK, dibuktikan bahwa pada penderita PJK jumlah *S. sanguinis* didalam plak dan saliva lebih tinggi dibandingkan dengan pada non PJK.^{11,12} Beberapa penelitian pada hewan coba membuktikan bahwa *S. sanguinis* dapat menyebabkan agregasi platelet¹³, dan kalsifikasi aorta.¹⁴

Di Indonesia pada saat ini, penelitian mengenai *S. sanguinis* tidak sebanyak penelitian mengenai *S. mutans*. Penelitian lebih lanjut mengenai *S. sanguinis* perlu dilakukan karena besarnya peranan *S. sanguinis* pada penyakit periodontal maupun hubungannya dengan penyakit sistemik. Sebagai penelitian awal, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis morfologi koloni dan keragaman genotip *Streptococcus sanguinis* yang berasal dari plak gigi dan saliva penderita penyakit jantung koroner. Penelitian selanjutnya akan diteliti perbedaan genotip dan karakteristik fenotipnya dengan yang non PJK. Konformasi *S. sanguinis* dilakukan dengan

teknik PCR berdasarkan gen 16S rDNA dengan menggunakan probe SSA-2 yang mengacu pada penelitian Yihong Li dkk. terhadap 200 primer PCR yang membuktikan bahwa probe SSA-2 merupakan probe DNA yang specific untuk *S. sanguinis*.¹⁵

BAHAN DAN METODE

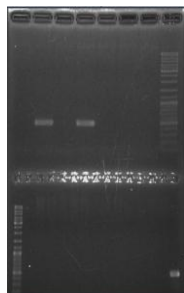
Subjek penelitian adalah 17 penderita penyakit jantung koroner di Bagian Jantung RS Cipto Mangunkusumo Jakarta. Plak pada permukaan lingual rahang bawah dan saliva diambil sebagai sampel. Saliva, dan plak dimasukkan ke dalam cairan PBS, kemudian masing-masing diambil 0,5cc dan disebar pada biakan agar Mitis salivarius yang mengandung sukrose 5%, yaitu kadar sukrose yang sesuai untuk *S. sanguinis*. Setelah diinkubasi selama 3 hari dalam suasana anaerob, koloni yang sesuai dengan morfologi koloni *S. sanguinis* yaitu lekat, berbentuk bulat dengan inti padat seperti bintang¹⁵, diambil untuk dibuat biakan murni pada Plat Agar Darah. Caranya dengan mengambil 1 koloni dari biakan agar Mitis salivarius, dimasukkan kedalam 0,2cc NaCl, diaduk dengan apendorf supaya koloni terpisah, lalu disebar dalam Plat Agar Darah yang dibuat dari Standard Nutrient Agar dicampur dengan darah 5%. Didapatkan 50 koloni, 35 koloni dari plak gigi, dan 15 koloni dari saliva. Hasil biakan diekstrak DNA nya dengan Gene Jet Genomic DNA Purification Kit #KO721, #KO722 merk Fermentas. Kemudian dikonformasi adanya *S. sanguinis* dengan teknik PCR berdasarkan gen 16S rDNA dengan menggunakan probe SSA-2 dari Yihong Li dkk. yaitu F2: GAA GCC ATT TTG CCT AGA TTG ATG G dan R2: CCA TAC CGA TTC CTT ACT CTA AAT TT, dengan amplifikasi spesifik regio intergenik 475-bp¹⁵, dan *S. sanguinis* standard ATCC 10556. Koloni yang telah terkonformasi sebagai *S. sanguinis* dianalisis morfologinya; sedangkan keragaman genotip dianalisis dengan mengacu pada profil AP-PCR dari primer OPA-02.

HASIL

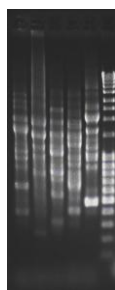
Dari 50 koloni bakteri, yaitu 35 berasal dari plak gigi dan 15 dari saliva, diduga sebagai *S. sanguinis* atas dasar morfologi koloninya, setelah dikonfirmasi dengan probe SSA-2 dan *S. sanguinis* standard ATCC 10556 (Gambar 1), didapat 4 koloni *S. sanguinis* (8%), yaitu 1 koloni berasal dari saliva, dan 3 koloni dari plak gigi. Keempat koloni menunjukkan morfologi lekat, berbentuk bulat dengan inti padat seperti bintang (Gambar 3). Dengan pembesaran 100x, terlihat tepi koloni tidak teratur,

demikian juga intinya padat dan tidak teratur; dan keempat koloni menunjukkan gambaran yang berbeda-beda (Gambar 4-5).

Keragaman genotip *S. sanguinis* dengan primer OPA-2 didapatkan 4 genotip yang berbeda (Gambar 2).

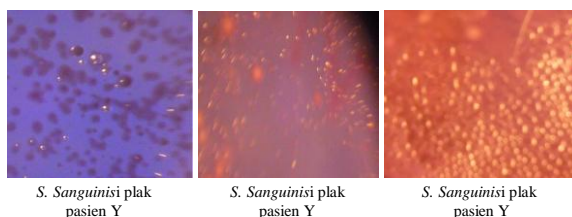


Gambar 1. Konfirmasi *S. Sanguinis* dengan probe SSA-2 pada 475 bp

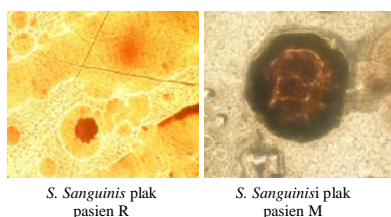


Gambar 2. Dengan OPA-2 didapatkan 4 keragaman genotip *S. Sanguinis*

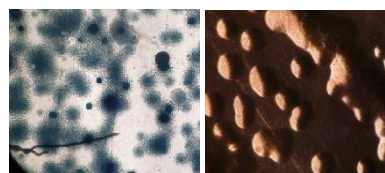
Gambaran morfologi koloni *S. sanguinis* yang ditemukan dapat dilihat pada Gambar 3,4, dan 5:



Gambar 3. *S. sanguinis* dari plak gigi dalam biakan agar dengan pembesaran 10x: pasien Y dan M dalam agar M. Salivarius, pasien R dalam plat agar darah



Gambar 4. *S. sanguinis* dari plak gigi pasien R dan M dalam biakan agar M. Salivarius dengan pembesaran 100x



S. Sanguinis plak pasien Y

S. Sanguinis saliva pasien R

Gambar 5. *S. sanguinis* dari plak gigi pasien R dan saliva pasien M dalam biakan agar M. Salivarius dengan pembesaran 100x

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini sebagai biakan awal digunakan biakan yang spesifik untuk golongan *Streptococcus* yaitu biakan agar Mitis salivarius, dengan kandungan sukrosa 5%. *Streptococcus* lain umumnya membutuhkan sukrosa dengan konsentrasi >5%, misalnya *S. mutan*. Namun dengan konsentrasi sukrosa 5% *streptococcus* lain masih ada yang tumbuh. Dari 50 koloni yang diekstrak dan dianalisis dengan probe SSA-2, hanya 4 koloni yang terbukti *S. sanguinis* (8%), yaitu 1 koloni berasal dari saliva, dan 3 koloni dari plak gigi. Bila digunakan perbenihan yang lebih spesifik untuk *S. sanguinis*, diharapkan akan didapatkan *S. sanguinis* dengan persentase yang lebih besar sehingga analisis mengenai keragaman genotip dan karakteristik fenotip *S. sanguinis* lebih mudah dilakukan. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan perbenihan yang lebih spesifik untuk *S. sanguinis*.

Dengan pembesaran 10x keempat koloni. *S. sanguinis* menunjukkan morfologi yang hampir sama, yaitu lekat, berbentuk bulat dengan inti padat seperti bintang. Dengan pembesaran 100x, tepi koloni berbentuk tidak teratur, demikian juga intinya padat dan tidak teratur, dan keempatnya menunjukkan morfologi yang berbeda terutama yang berasal dari saliva, bentuk bulatnya tidak sejelas seperti yang berasal dari plak. Perbedaan ini mungkin disebabkan karena profil genotipnya berbeda.

Sebagai kesimpulan, Morfologi koloni *S. Sanguinis* jelas, lekat, berbentuk bulat dengan inti padat seperti bintang. Didapatkan 4 keragaman genotip *S. sanguinis* didalam plak gigi dan saliva pasien PJK.

Disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan perbenihan yang lebih spesifik untuk *S. sanguinis*, sehingga analisis lebih lanjut mengenai *S. sanguinis* lebih mudah dilakukan.

Daftar Pustaka

1. Thomas G. Coronary artery disease-need for better terminology. Br J Cardiol 2009; 16: 192-3.
2. Luthra K, Luthra S, Aggarwal N, Luthra S. Gum bugs hit heart: State of the science. J Oral Health

- and *Comm Dent* 2011; 5(3): 164-7.
3. Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 5th ed., Munksgaard: Blackwell, 2008; 185-7.
 4. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. *Carranza's clinical periodontology*. 10th ed., St Louis: Saunders, 2006; 143-7.
 5. Mc Nicol A, Agpalza A, Jackson EC, Hamzeh-Cognasse H, Garraud O, Cognasse F. Streptococcus sanguinis-induced cytokine release from platelets. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 2038-49.
 6. Mc Nicol A, Zhu R, Pesun R, Pampolina C, Jackson EC, Bowden GHW, et al. A role for immunoglobulin G in donor specific Streptococcus sanguis induced platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 2006; 95: 288-93.
 7. Kemal Y, Oemardi M, Prasetyo S. The correlation between periodontal and coronary artery disease status in type 2 diabetes mellitus patients. *Asian Pacific Society Periodontol* 2000: 96-101.
 8. Bavunoglu I, Saahin S, Yilmaz M, Toptas T, Tabak F, Tunckalle A. Nativee triple-valve endocarditis caused by penicillin-resistant Streptococcus sanguis. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2007; 4: 340-3.
 9. Yamaguchi M, Terao Y, Ogawa T, Takahashi T, Hamada S, Kawabata S. Role of Streptococcus sanguinis sortase a in bacterial colonization. *Microbes and Infection* 2006; 8: 2791-96.
 10. Ge X, Kitten T, Chen Z, Lee SP, Munro CL, Xu P. Comprehensive evaluation of Streptococcus sanguinis cell wall-anchored proteins in early infective endocarditis. *Infect Immun* 2009; 77: 4966-75.
 11. Deng S, Chen H, Zhang W. The relativity between Streptococcus sanguis group and coronary heart disease. *Zhounghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2002; 37: 222-4.
 12. Chen H, Zhang WD. 3877 Streptococcus sanguis group in oral cavities of coronary heart disease patients IADR/AADR/CADR 80th General session, San Diego, 2002.
 13. Kerrigan SW, Douglas I, Wray A, Heath J, Byrne MF, Fitzgerald D, et al. A role for glycoprotein Ib in Streptococcus sanguis-induced platelet aggregation. *Blood* 2002; 100: 509-16.
 14. Cohen DJ, Malave D, Ghidoni JJ, Iakovidis P, Everett MM, You S, et al. Role of oral bacterial flora in calcific aortic stenosis: An Animal Model. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 537-43.
 15. Li Y, Pan Y, Qi F, Caufield PW. Identification of Streptococcus sanguinis with a PCR-generated species-specific DNA probe. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3481-86.