

Research Report

## Kadar *human beta defensin 2* (HBD-2) pada kelompok karies dan bebas karies

(The levels of *human beta defensin 2* (HBD-2) in caries group and caries free group)

Koerniasari Eraiko\*, Wisnu Setyari\*\*, Rini Devijanti\*\*, Retno Indrawati\*\*

\*Mahasiswa Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya - Indonesia

\*\* Staf Pengajar Departemen Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya - Indonesia

### ABSTRACT

**Background:** Defensins are antimicrobial peptide which classified into two subfamilies, the  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensins. Human  $\beta$  defensins 1 (HBD-1),  $\beta$  defensins 2 (HBD-2),  $\beta$  defensins 3 (HBD-3),  $\beta$  defensins (HBD4) and  $\alpha$  defensins 1-4 (HNP1-4) have an important role in caries. In the oral cavity, HBD-2 are present in saliva and have antimicrobial activities against oral bacteria, including *Streptococcus mutans*, a primary etiologic agent of dental caries. This study aimed to determine levels of  $\beta$  defensins 2 (HBD-2) in saliva samples of caries and free caries. **Methods:** Saliva samples were obtained from 50 students of elementary school were divided into two group: the caries-free group and caries group. The salivary levels of  $\beta$  defensins 2 (HBD-2) in subjects were measured by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). **Results:** The average salivary levels of HBD-2 were 266,15 ng/L for the caries-free group and 483,63 ng/L for the caries group respectively. There were significantly difference in the HBD-2 level between patients with caries and patients with free caries ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** We conclude that high salivary levels of HBD-2 may represent a biological response of oral tissue to caries. HBD2 can be developed as biomarker to indicate caries and a new tool for caries risk assessment.

**Key words :** Saliva, HBD-2, free caries, caries.

### ABSTRAK

**Latar Belakang:** Defensin adalah peptida antimikroba yang diklasifikasikan ke dalam dua subfamili yaitu  $\alpha$  dan  $\beta$  defensin. *Human  $\beta$  Defensin 1* (HBD-1), *Human  $\beta$  Defensin 2* (HBD-2), *Human  $\beta$  Defensin 3* (HBD-3), *Human  $\beta$  defensin 4* (HBD-4) dan *Human  $\alpha$  Defensin 1-4* (HNP1-4) memiliki peran penting dalam karies. Dalam rongga mulut, HBD-2 yang terdapat dalam saliva berfungsi sebagai antimikroba terhadap bakteri dalam rongga mulut, termasuk *Streptococcus mutans* yang merupakan penyebab utama dari karies gigi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kadar HBD-2 pada saliva penderita karies dan bebas karies. **Metode:** Sampel saliva diperoleh dari 50 siswa sekolah dasar yang dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok bebas karies dan kelompok karies. Kadar HBD-2 pada saliva dari semua kelompok diukur dengan *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA). **Hasil:** Rata-rata kadar HBD-2 dalam saliva adalah 266,15 ng/ml untuk kelompok bebas karies dan 483,63 ng/ml untuk kelompok karies. Terdapat perbedaan kadar HBD-2 antara penderita karies dan bebas karies ( $p < 0,05$ ). **Kesimpulan:** Dapat disimpulkan bahwa kadar HBD-2 yang tinggi dalam saliva merupakan respons biologis dari rongga mulut terhadap karies. HBD-2 dapat dikembangkan sebagai biomarker untuk menunjukkan karies dan sebagai alat baru untuk mendeteksi resiko karies

**Kata kunci:** Saliva, HBD-2, bebas karies, karies

Korespondensi (*Correspondence*): Koerniasari Eraiko, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga  
Jln Mayjend Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132, Indonesia.

## PENDAHULUAN

Karies gigi merupakan salah satu penyakit gigi dan mulut yang banyak diderita oleh masyarakat Indonesia dengan prevalensi yang masih sangat tinggi. Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2007 yang diselenggarakan Departemen Kesehatan Republik Indonesia menunjukkan bahwa kerusakan gigi karena karies dialami oleh 72,1% penduduk, dan di antaranya 46,5% merupakan karies aktif yang tidak mendapatkan perawatan.<sup>1</sup>

Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa tingginya karies gigi sebanding dengan tingginya jumlah *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), yang merupakan bakteri penyebab karies gigi. Keadaan lingkungan mikroorganisme dalam rongga mulut serta respon imun *host* dapat merubah sifat *S. mutans* sebagai flora normal menjadi oportunistik patogen dan beberapa penelitian melaporkan rendahnya sIgA (*secretory immunoglobulin A*) dalam saliva *host* berkorelasi dengan tingginya karies gigi.<sup>2,3</sup>

Saliva merupakan sistem pertahanan yang mempunyai peran penting dalam menjaga kesehatan rongga mulut dan mencegah karies. Pertahanan ini meliputi faktor-faktor yang menghambat proses demineralisasi, *mechanical rinsing*, kapasitas bufer, kalsium fosfat *binding* protein, serta sekresi *Anti Microbial Peptides* (AMPs). Salah satu AMPs yang terdapat dalam saliva adalah defensin yang mempunyai peran sangat penting dalam sistem *innate immune* dan mempunyai aktivitas antimikroba yang luas terhadap bakteri Gram negatif maupun Gram positif dalam rongga mulut seperti, *S. mutans*, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) dan *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*).<sup>4,5,6</sup>

Pada manusia hanya terdapat dua kelompok defensin yaitu,  $\alpha$ -defensin dan  $\beta$ -defensin. *Human  $\beta$ -defensin* (HBD) diekspresikan pada gingiva, lidah, kelenjar saliva, mukosa dan terdapat pada jaringan epitel seperti kulit, saluran pernafasan, saluran pencernaan, termasuk mukosa rongga mulut.<sup>7,8</sup> Sampai saat ini, terdapat empat macam HBDs yaitu HBD-1-4 yang mempunyai efek antimikroba terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif.<sup>9,10,11</sup>

Ekspresi HBD-1-3 ditemukan pada saliva sedangkan HBD-4 lebih dominan ditemukan di testis serta epitel lambung dan belum terdeteksi dalam saliva pada manusia.<sup>9,11</sup>

HBD-2 dapat ditemukan pada tempat infeksi di rongga mulut dan efektif sebagai anti bakteri terhadap *A. actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *P. gingivalis*, *Peptostreptococcus micros* (*P. micros*), *Actinomyces naeslundii* (*A. naeslundii*), *Actinomyces israelii* (*A. israelii*), *Streptococcus sanguis* (*S. sanguinis*), *S. mutans*.<sup>5</sup> HBD-2 juga dapat meningkatkan respon *innate immune* sehingga dapat berperan dalam menurunkan resiko terjadinya karies.

Oleh karena HBD-2 pada saliva mempunyai peran yang sangat penting dalam sistem *innate immune* dan mempunyai aktivitas antimikroba yang luas terhadap bakteri dalam rongga mulut seperti pada *S. mutans* yang merupakan bakteri penyebab karies gigi, maka sangat perlu dilakukan penelitian untuk membuktikan adanya perbedaan antara kadar HBD-2 dari saliva yang bebas karies dengan penderita karies gigi sehingga dari hasil penelitian ini dapat ditemukan dan dikembangkan biomarker baru dari saliva yang dapat digunakan untuk diagnosis dini pada penderita karies.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dan rancangan penelitian ini adalah *case-control study*, dilaksanakan di SD Qomaruddin di Kabupaten Gresik mulai Oktober - Desember 2013. Sampel penelitian adalah penderita karies dan bebas karies yang memenuhi kriteria inklusi. Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah siswa laki-laki atau perempuan umur 6-7 tahun yang menderita karies dan bebas karies.

Penderita karies dan bebas karies bersedia dan mengisi formulir *informed consent* untuk menjadi subjek penelitian, sedangkan kriteria eksklusi adalah siswa yang tidak sedang mendapat pengobatan yang dapat menekan respon imun.

Besar sampel pada penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus (Lemeshow and David, 1997) dan didapatkan besar sampel minimal adalah 18 siswa untuk masing masing kelompok penderita karies berdasarkan hasil pemeriksaan mempunyai indeks  $dmf-t \geq 5$  dan bebas karies berdasarkan hasil pemeriksaan mempunyai indeks  $dmf-t = 0$ .

Pengambilan saliva pada kelompok karies dan bebas karies dilakukan dengan cara pengumpulan *whole* saliva tanpa stimulasi menurut metode (Navazesh and Kumar, 2008), sebagai berikut: Subyek penelitian diminta untuk tidak makan dan minum (kecuali air putih) selama 1 jam sebelum dilakukan koleksi saliva, kemudian berkumur beberapa kali dengan air bersih dan duduk dengan posisi santai selama 5 menit. Subyek dianjurkan untuk melakukan pergerakan seminimal mungkin terutama pergerakan pada rongga mulut dan diminta mencondongkan kepala ke depan dengan posisi agak menunduk, dengan posisi di atas tabung *Falcon* steril. Dalam keadaan mulut agak terbuka, pengumpulan saliva dilakukan dengan cara mengalirkan ke dalam tabung *Falcon* steril sampai mencapai jumlah 10 ml. Saliva yang diperoleh disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm, temperatur 4° C, selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh disimpan di dalam tabung *eppendorf* dengan suhu -80°C selanjutnya dilakukan pemeriksaan dengan ELISA.

Hasil kadar HBD-2 dari pemeriksaan ELISA di analisis dengan uji normalitas, uji homogenitas dan uji t.

**HASIL**

Pemeriksaan kadar HBD-2 telah dilakukan pada sampel saliva yang berasal dari siswa SD Qomaruddin di wilayah Gresik sebanyak 20 orang bebas karies dengan indeks  $dmf-t = 0$  dan 30 orang yang menderita karies gigi dengan indeks  $dmf-t \geq 5$ . Semua siswa SD yang diambil salivanya dalam keadaan umum yang sehat dan tidak sedang mendapatkan pengobatan yang dapat menekan respon imunnya.

Hasil uji *One-Sample Kolmogorov-Smirnov* kadar HBD-2 kelompok bebas karies

adalah  $p= 0.870$  dan kelompok penderita karies adalah  $p= 0.051$ . Hasil ini menunjukkan bahwa kadar HBD-2 terdistribusi normal baik pada kelompok bebas karies maupun pada kelompok penderita karies dengan  $p>0,05$ , sedangkan hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa varians data adalah homogen sehingga analisis data memenuhi persyaratan untuk dilanjutkan menggunakan uji t sampel independen untuk membedakan perbedaan kadar HBD2 antara kelompok bebas karies dan penderita karies. Hasil analisis statistik Uji t sampel independen kadar HBD-2 diperoleh  $p<0,05$  ( $p=0,000$ ), yang berarti ada perbedaan yang signifikan antara kadar HBD-2 kelompok bebas karies dengan kelompok penderita karies seperti terlihat pada tabel 1. Dimana kadar HBD-2 kelompok penderita karies lebih tinggi dari pada kelompok bebas karies

Tabel 1. Rerata dan simpangan baku kadar HBD-2 kelompok penderita karies dan bebas karies

Kelompok	Kadar HBD-2 $\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)
Bebas Karies	266.15 <sup>a</sup> ± 67.85
Penderita Karies	483.63 <sup>b</sup> ± 91.22

Superskrip yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan

**PEMBAHASAN**

Defensin yang terdapat dalam saliva merupakan salah satu peptida antimikroba yang mempunyai peran sangat penting dalam sistem *innate immune* maupun *adaptive immune* dan mempunyai aktivitas antimikroba yang luas terhadap bakteri Gram positif dalam rongga mulut seperti pada *S. mutans* yang merupakan bakteri penyebab karies gigi.<sup>15</sup>

*Human β-defensin* (HBD) dapat ditemukan pada gingiva, lidah, kelenjar saliva, mukosa dan seluruh jaringan epitel termasuk dalam rongga mulut. Human β-defensin terutama HBD-2 dan HBD-3 banyak terdapat pada tempat infeksi di rongga mulut dan sangat efektif untuk mencegah terjadinya infeksi bakteri *S. mutans*.<sup>16</sup> HBD-1 mempunyai peran untuk mencegah bakteri komensal yang ada dalam rongga mulut menjadi bakteri yang patogen, sedangkan HBD-2 dan HBD-3 merupakan antimikroba yang induksibel (kadarnya dapat meningkat apabila

ada rangsangan dari mikroba) dan berperan efektif untuk melawan bakteri yang patogen.<sup>4</sup>

Pada hasil penelitian yang telah dilakukan, memperlihatkan adanya perbedaan antara kadar HBD-2 dari saliva kelompok bebas karies dengan kelompok karies, dimana kadar HBD-2 pada saliva kelompok karies lebih tinggi dari pada kelompok bebas karies. *S. mutans* akan berikatan dengan *Toll Like Receptor-2* (TLR-2) pada sel epitel rongga mulut dan dapat meningkatkan produksi *Nuclear Factor kappa Beta* (NF-kB) di inti sel. NF-kB ini dapat meningkatkan sitokin proinflamasi IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8 dan TNF  $\alpha$  sehingga dapat menyebabkan peningkatan kadar HBD-2. Telah dilaporkan bahwa *S. mutans* dapat merangsang TLR-2 pada sel epitel yang dapat menyebabkan meningkatnya NF-kB sehingga dapat meningkatkan sitokin inflamasi IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8 dan TNF- $\alpha$ <sup>17,18,19,20</sup>, sedangkan Ouhara *et al* (2006) melaporkan bahwa peningkatan sitokin proinflamasi IL-1  $\beta$ , IL-6, IL-8 dan TNF- $\alpha$  pada sel *epithel* ginggiva yang disebabkan oleh *A. actinomycetemcomitans*, dapat meningkatkan ekspresi HBD-2.<sup>14</sup>

Dale (2006) melaporkan bahwa defensin dalam saliva dan rongga mulut memiliki peran yang sangat penting dalam melindungi gigi dari karies dan melindungi mukosa mulut. Hal ini karena defensin memiliki aktivitas antimikroba yang luas, selain itu defensin merangsang sistem *innate immune* yang dapat berfungsi untuk meningkatkan produksi IgA serta produksi IgG dan defensin juga dapat berfungsi sebagai antibakteri pada karies gigi. HBD-2 juga merupakan antimikroba peptida yang mempunyai efek anti bakteri sangat efektif dan mempunyai spektrum yang luas terhadap bakteri Gram positif seperti *S. mutans* sehingga dapat menghambat perkembangan karies gigi.<sup>21</sup>

Pada hasil penelitian ini menunjukkan kadar HBD-2 pada sampel saliva kelompok bebas karies lebih rendah bila dibandingkan dengan kadar HBD-2 pada kelompok karies. Adanya kadar HBD-2 pada kelompok bebas karies ini juga disebabkan karena adanya rangsangan dari bakteri komensal yang terdapat dalam rongga mulut.<sup>22</sup>

HBD-2 juga dapat menyebabkan kemotaksis dari sel dendrit, sel neutrophil, dan T-limfosit. HBD-2, merangsang produksi sitokin seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  yang semuanya ini dapat meningkatkan sistem pertahanan tubuh terhadap infeksi mikroba pada karies.<sup>23</sup>

Ekspresi HBD-2 dalam saliva tidak hanya dapat meningkatkan *innate immune* tetapi juga *adaptive immune* pada mukosa mulut yang mempunyai peran dalam membantu untuk menghambat *S. mutans* dalam rongga mulut sehingga dapat mencegah perkembangan karies gigi.<sup>6,21</sup> Pada beberapa model infeksi dan sepsis secara *in vivo* menunjukkan bahwa defensin HBD-2 merupakan pertahanan tubuh yang dapat meningkatkan respons kekebalan untuk menghambat inflamasi akibat mikroba yang patogen.<sup>24</sup>

Faktor genetik juga dapat menentukan produksi kadar HBD-2 pada saliva sehingga dapat mempengaruhi kerentanan terhadap terjadinya karies pada gigi. Adanya variasi konsentrasi defensin dalam saliva bisa disebabkan gen yang mengkode peptida ini.<sup>25</sup>

## SIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan kadar HBD-2, pada kelompok karies mempunyai kadar HBD-2 lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok bebas karies.

## SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui peran defensin lainnya seperti HNP1-3, HBD-3 terhadap perkembangan karies yaitu dengan mengukur dan membandingkan kadar HNP1-3, HBD-3 pada bebas karies dan penderita karies dan perlu dilakukan karakterisasi profil protein HBD-2 untuk dikembangkan sebagai biomarker pada penderita karies.

## ACKNOWLEDGMENT

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Dr. Retno Indrawati selaku ketua penelitian dan penelitian ini merupakan bagian dari pohon

penelitian yang didanai desentralisasi Universitas Airlangga 2013.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Departemen Kesehatan (Depkes) RI. Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Nasional. 2007. Available from <http://www.kesehatan.kebumenkab.go.id>. Accessed on March 30 th, 2011.
2. Featherstone J. The Science and Practice of Caries Prevention. *JADA*. 2000. 7: 888- 897.
3. Hicks J, Godoy FG, Flaitz C. Biological Factors in dental caries : role of saliva and dental plaque in dynamic process of demineralization and remineralization, *J Pediatric dental*. 2003. 1 : 47-56.
4. Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Iss. Mol Biol*. 2005. 7:119- 33.
5. Joly S, Maze C, McCray PB Jr, Guthmiller JM. Human betadefensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol*. 2004. 42(3):1024-1029.
6. Nishimura E, Eto A, Kato M, Hashizume S, Imai S, Nisizawa T, Hanada N. Oral streptococci exhibit diverse susceptibility to human beta-defensin-2: antimicrobial effects of hBD-2 on oral streptococci. *Curr Microbiol*. 2004. 48(2):85-87.
7. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003. 3:710–720.
8. Lehrer, R.I. and Ganz, T. Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol*. 2000. 14: 96–102.
9. Dunsche A, Açıllı Y, Dommisch H, Siebert R, Schröder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *J Oral Sci*. 2000. 110 : 121-124
10. Garcia, J.R.C, Jaumann, F., Schulz, S., Krause, A., Rodriguez-Jiminez,J., Forssmann, U., Adermann, K., Klüver, E., Vogelmeier, C., Becker, D., Hedrich, R., Forssmann, W.G., Bals, R. Identification of a novel multifunctional -defensin (human-defensin 3) with specific antimicrobial activity. *Cell Tissue Res*. 2001. 306, 257–264.
11. Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schroder, J.M. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*. 2001. 276 : 5707-5713
12. Dale BA, Tao R, Kimball JR, Jurevic RJ. Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. *BMC Oral Health*. 2006. 6 (Suppl 1):S13.
13. Lemeshow S dan David WHJ. Besar Sampel dalam Penelitian Kesehatan (terjemahan). Yogyakarta: Gadjahmada University Press. 1997
14. Ouhara K, Komatsuzawa H, Shiba H, Uchida Y and Sugai M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Outer Membrane Protein 100 Triggers Innate Immunity and Production of Defensin and the 18-Kilodalton Cationic Antimicrobial Protein through the Fibronectin-Integrin Pathway in Human Gingival Epithelial Cells. *Infection and Immunity*. 2006. p. 5211–5220
15. Abiko, Y. & Saitoh, MM. Salivary defensins and their importance in oral health and disease. *Curr Pharm Des* 13. 2007. 3065-3072
16. Tao R, Jurevic RJ, Coulton KK, Tsutsui MT, Roberts MC, Kimball JR, Wells NJ, Berndt J, Dale BA. Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005. 49(9):3883-3888.
17. Kim JS, Kim KD, Na HS, Jeong SY, Park HR, Kim S and Chung J. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  expression pathway induced by *Streptococcus mutans* in macrophage cell line RAW 264.7. *Mol Oral Microbiol*. 2012. Jun;27(3):149-59.
18. Musikacharoen T, Matsuguchi T, Kikuchi T and Yoshikai Y. NF-kappa B and STAT5 play important roles in the regulation of mouse Toll-like receptor 2 gene expression. *J. Immunol*. 2001. 166(7):4516-24.
19. Saeki A, Segawa T, Abe T, Sugiyama M, Arimoto T, Hara H, Hasebe A, Ohtani M, Tanizume N, Ohuchi M, Kataoka H, Kawanami M, Yokoyama A and Shibata K. Toll-like receptor 2-mediated modulation of

- growth and functions of regulatory T cells by oral streptococci. *Mol Oral Microbiol.* 2013. 28(4):267-80.
20. Hicks J, Godoy FG, Flaitz C. Biological Factors in dental caries : role of saliva and dental plaque in dynamic process of demineralization and remineralization, *J Pediatric dental.* 2003. 1 : 47-56.
  21. De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett.* 2005. 27:1337-47.
  22. Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Teran LM. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol.* 2010. 135: 1-11.
  23. Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract native and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 2000. 68:9-14.
  24. Allaker RP. Host defence peptides a bridge between the innate and adaptive immune responses. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008. 102: 3-4.
  25. Tossi A, Sandri L. Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Curr Pharm.* 2008. 8: 743-761.