

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI  
(PTUPT)**



**UJI STABILITAS PROTOTYPE KIT DIAGNOSTIK HLA-DRB1 UNTUK  
DETEKSI PRESYMPTOMATIK KARIES GIGI PADA ANAK**

**TAHUN KE – 2 DARI RENCANA 2TAHUN**

**Dr.Pratiwi Soesilawati,drg.,MKes 0022116903  
Prof Dr.Harianto Notopuro,dr.,MS 0013124901  
Yuliati,drg.,MKes 0024077404**

**DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI  
(PTUPT)**



KKA  
KK  
48/19  
Soe  
u

**UJI STABILITAS PROTOTYPE KIT DIAGNOSTIK HLA-DRB1 UNTUK  
DETEKSI PRESYMPTOMATIK KARIES GIGI PADA ANAK**

**TAHUN KE - 2 DARI RENCANA 2TAHUN**

**Dr.Pratiwi Soesilawati,drg.,MKes 0022116903**  
**Prof Dr.Harianto Notopuro,dr.,MS 0013124901**  
**Yuliati,drg.,MKes 0024077404**

**DIBIYAI OLEH:**  
**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT**  
**DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN**  
**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI**  
**SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN**  
**KEPADA MASYARAKAT**  
**NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
**NOVEMBER 2018**

**HALAMAN PENGESAHAN**

Judul : UJI STABILITAS PROTOTYPE KIT DIAGNOSTIK  
HLA-DRB1 UNTUK DETEKSI PRESYMPTOMATIK  
KARIES GIGI PADA ANAK

**Peneliti/Pelaksana**  
 Nama Lengkap : Dr PRATIWI SOESILAWATI, M.Kes  
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
 NIDN : 0022116903  
 Jabatan Fungsional : Lektor  
 Program Studi : Kedokteran Gigi  
 Nomor HP : 081703968754  
 Alamat surel (e-mail) : pratiwi-s@fkg.unair.ac.id

**Anggota (1)**  
 Nama Lengkap : Dr. Drs HARIANTO NOTOPURO  
 NIDN : 0013124901  
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Anggota (2)**  
 Nama Lengkap : YULIATI S.KG, M.Kes  
 NIDN : 0024077404  
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Institusi Mitra (jika ada)**  
 Nama Institusi Mitra : -  
 Alamat : -  
 Penanggung Jawab : -  
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun  
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000  
 Biaya Keseluruhan : Rp 190,300,000



Mengetahui,  
Wakil Dekan I

(Prof. Dr. Anita Yulianti, drg., MKes)  
NIP/NIK 195807091985031001

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018

Ketua,

(Dr PRATIWI SOESILAWATI, M.Kes)  
NIP/NIK 196911221996012001

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian Inovasi



(Prof Drs H Hery Purnobasuki, MSi., PhD)  
NIP/NIK 196705071991021001



## PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala karuniaNya yang dilimpahkan kepada kami selama melakukan penelitian ini hingga dapat terselesaikan tepat waktu. Harapan kami semoga laporan penelitian ini dapat bermanfaat bagi pembaca pada umumnya dan bagi para peneliti pada khususnya.

Dengan telah selesainya penelitian ini, peneliti mengucapkan terimakasih kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga, yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas pada peneliti untuk melakukan penelitian ini.
2. Ketua Lembaga Penelitian Dan Inovasi Universitas Airlangga, yang telah menyetujui usulan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2018
3. Dekan Fakultas kedokteran gigi Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin untuk melaksanakan penelitian ini.
4. Departemen Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dan Institut Biosains Universitas Brawijaya yang telah menyediakan fasilitas penelitian.

Kepada semua pihak yang tak dapat kami sebut satu persatu, yang telah membantu kami hingga selesainya penelitian ini, kami sampaikan terimakasih. Kami mohon saran dan kritik bila ada kesalahan dalam penulisan laporan penelitian ini. Semoga Tuhan Yang Maha Kuasa meridloi kita semua. Amin.

Surabaya, November 2018

Peneliti

## DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN SAMPUL	
HALAMAN PENGESAHAN	1
RINGKASAN	2
PRAKATA	3
DAFTAR ISI	4
BAB I. PENDAHULUAN	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	8
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	19
BAB IV. METODE PENELITIAN	21
BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	24
BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	28
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	32
Draft Paten	32

## RINGKASAN

Varian HLA-DRB1 pada populasi Indonesia khususnya populasi Jawa di Surabaya telah diteliti dan ditemukan satu varian sesuai *gen bank* yaitu DRB\*1209 dan empat varian baru HLA-DRB1 yaitu DRB\*1209(1), DRB\*1209(2), DRB\*1209(3) dan DRB\*1209(4). DRB\*1209 dan DRB\*1209(1) merupakan varian HLA-DRB1 pada populasi dengan prevalensi karies rendah (indeks *def-t*  $\leq 2$ ) dan tinggi titer sIgA ( $>300\text{ng/mL}$ ), sedangkan DRB\*1209(2), DRB\*1209(3) dan DRB\*1209(4) merupakan varian HLA pada populasi dengan tinggi prevalensi karies gigi (*def-t*  $\geq 3$ ) dan rendah titer sIgA ( $<300\text{ng/mL}$ ). Pemahaman karies gigi pada tingkat molekuler adalah langkah pencegahan karies gigi yang potensial. Hal ini sangat bermanfaat dalam upaya mengungkap kompleksitas penyakit karies gigi untuk merancang metode diagnosa, pencegahan dan perawatan karies di suatu populasi. Prevalensi karies gigi di benua Asia, Afrika dan Amerika menunjukkan peningkatan yang tajam dalam 10 tahun terakhir. Beberapa laporan menjelaskan kontribusi faktor genetik risiko karies gigi, yaitu Human Leukocyte Antigen DRB1 (HLA-DRB1), suatu lokus pada MHC kelas II yang menyandi sekresi *secretory Immunoglobulin antibody A* (sIgA) dalam saliva. Dalam rongga mulut sIgA berfungsi sebagai penghambat adhesi *streptococcus mutans* pada permukaan enamel. Berbagai varian HLA-DRB1 pada populasi Jawa di Surabaya terjadi akibat mutasi pada regio ekson 2 lokus HLA-DRB1 berbentuk *Single Nucleotide polymorphism* (SNP). Metode diagnosa presymptomatik imunogenetik adalah diagnosa tanpa menunggu timbulnya gejala suatu penyakit. Jika prediksi karies gigi yang akan terjadi pada anak-anak mampu dilakukan melalui pemeriksaan imunogenetik, maka pencegahan dapat dilakukan bahkan sebelum gigi permanen erupsi. Hal ini sangat efisien untuk mencegah timbulnya biaya perawatan tinggi, rasa nyeri dan menurunnya kualitas hidup yang disebabkan oleh karies gigi. Dalam beberapa tahun terakhir kebutuhan klinis untuk pemeriksaan genotip HLA tampak meningkat. Namun, penggunaan PCR rutin berbasis isolasi DNA terhambat oleh pertimbangan ekonomis dan atau teknis. Metode klasik PCR-SSO (*sequence-specific oligonucleotides*) telah diuji secara luas dan terbukti berguna untuk pemeriksaan HLA skala besar. Namun, PCR-SSO bukan metode yang tepat untuk pemeriksaan rutin sampel skala kecil karena membutuhkan waktu pemeriksaan beberapa hari. Untuk memecahkan hal itu, kami merancang teknik deteksi mutasi HLA-DRB1 ekson 2 melalui *allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction* (ASO-PCR). Untuk mendeteksi mutasi DNA, dirancang sepasang primer dari urutan oligonukleotida HLA-DRB1 yang telah diketahui dari hasil sekuensing pada penelitian sebelumnya. Primer dirancang pada ujung 3' yang terdapat mutasi akan berikatan dengan primer mutan dan tidak berikatan dengan primer normal. Untuk mendeteksi mutasi DNA pada sampel, primer ASO dari sampel normal atau mutan harus berikatan secara komplementer dengan DNA sampel. Jika terjadi ikatan komplementer, maka akan terjadi amplifikasi. Tujuan jangka panjang dari penelitian ini adalah menghasilkan kit diagnostik karies gigi berbasis imunogenetik melalui identifikasi varian lokus HLA-DRB1. Penelitian dilakukan pada 33 sampel, menggunakan primer ASO normal (DRB\*1209), dan oligoprobe ASO mutan dari DRB\*1209(1), DRB\*1209(2), DRB\*1209(3), serta DRB\*1209(4). Penelitian tahun kedua ditekankan pada penyusunan protokol pemeriksaan menggunakan oligonukleotida HLA-DRB1 normal dan mutan. Metode diagnostik yang sederhana, cepat dan murah ini diharapkan menjadi metode laboratorium pilihan untuk pemeriksaan genotyping HLA-DRB1 pada sampel skala kecil guna pemeriksaan rutin. Penentuan varian HLA-DRB1 ini selanjutnya dapat digunakan sebagai panduan para klinisi dalam menegakkan diagnosa pre-symptomatik dan penentuan arah terapi karies gigi. *Keyword* : HLA-DRB1, mutation, ASO-PCR, Indonesia



## BAB I PENDAHULUAN

### I.1. Latar Belakang

Karies gigi merupakan penyakit infeksi yang menimbulkan masalah kesehatan di beberapa negara maju dan berkembang. Penyakit ini merupakan penyebab utama gigi tanggal pada anak-anak maupun dewasa. Prevalensi karies gigi di negara berkembang seperti Indonesia dan Thailand menunjukkan peningkatan yang tajam dalam 20 tahun terakhir. Karies gigi telah merambah ke seluruh pelosok dunia, bahkan negara-negara maju seperti Amerika dan sebagian Eropa. *WHO Oral Health Database* menyatakan indeks *Decay, Missing, Filling Teeth* (DMFT) pada anak-anak usia 12 tahun pada 188 negara di dunia masih tinggi (Brathal, 2004; Bagramian *et al.*, 2009). Epidemiologi karies gigi di berbagai negara berkembang benua Asia seperti Indonesia, Thailand, Filipina, China, Taiwan, dan benua Afrika di Zambia, Sudan, Nigeria serta benua Amerika Selatan di Brazil menunjukkan peningkatan prevalensi karies gigi dalam 10 tahun terakhir (Yabao *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2006; Bajali *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2007).

Risiko karies gigi salah satunya dikendalikan oleh saliva karena keberadaan *Secretory Immunoglobulin A* (sIgA) sebagai substansi anti bakteri. Faktor yang berperan pada perkembangan karies gigi adalah respon inang, bakteri dalam plak sebagai antigen, kualitas dan kuantitas diet, serta waktu. Faktor genetik dan lingkungan diduga berperan pada peningkatan risiko karies gigi. Penelitian sebelumnya membuktikan terdapat hubungan antara aspek genetik dan respon imunitas terhadap karies gigi. Faktor genetik inang berpengaruh terhadap pengenalan antigen, respon imunitas dan pola diet. Penelitian pada manusia dan hewan membuktikan perbedaan genetik menyebabkan penyimpangan imunomodulator terhadap antigen yang berperan pada karies gigi (Acton *et al.*, 1999; Pinkham, 2005; Burgner *et al.*, 2006; Kindt *et al.*, 2006; Selwitz *et al.*, 2007; Barros & Offenbacher, 2009; Harris *et al.*, 2009; Robinette *et al.*, 2009).

HLA klas II adalah lokus dengan polimorfisme tinggi pada berbagai mamalia. Polimorfisme ini menyebabkan perbedaan ikatan peptida sehingga mempengaruhi progresi dan kerentanan suatu penyakit secara fungsional. HLA-DRB1 mempresentasikan antigen dari *Antigen Presenting Cell* (APC) kepada CD4+ sel T. Jumlah CD4 adalah indikator klinis utama dari kompetensi kekebalan tubuh serta berperan dalam penentuan diagnosa dan terapi. CD4+sel T menghasilkan sitokin yaitu *interleukin-2* (IL-2) untuk aktivasi dan diferensiasi sel T *helper* menjadi

subset sel efektor yaitu sel Th 1 dan sel Th2. IL-4 dari Th2 berperan pada stimulasi produksi antibodi oleh sel B. Th2 mengaktifasi proliferasi sel B, menyebabkan sel membelah menjadi sel B memori dan sel B efektor yang disebut sel plasma. Antibodi yang disekresi oleh plasma sel adalah molekul efektor mayor dari imunitas humoral. TGF- $\beta$ 1, IL-6 dan IL-5 mengaktifasi sel B melalui sistem MALT (*Mucosa-associated Lymphoid Tissue*) untuk melakukan *switching isotype* pada *membran-bound antibody* dari *Imunoglobulin M (IgM)* menjadi *Imunoglobulin A (IgA)*. (Shuler, 2001; Wright & Hart, 2002; Senpuku & Yumiko, 2004; Kindt *et al.*, 2006; Manasa *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2008; Abbas *et al.*, 2010).

Variasi genotip HLA-DRB1 disebabkan oleh mutasi pada ekson 2. Mutasi adalah perubahan sekuen nukleotida dari suatu gen. Sebagian besar mutasi berupa mutasi titik yaitu substitusi satu nukleotida dengan nukleotida lain atau delesi satu nukleotida. Mutasi ini disebut *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)*. Penggantian ini menyebabkan perubahan susunan pasangan basa sehingga menimbulkan perubahan susunan asam amino ( Trejaut *et al.*, 2001, Brown, 2007; Klug, 2007)

Mutasi regio ekson 2 lokus HLA-DRB1 berkaitan dengan patogenesis karies gigi, karena perubahan susunan asam amino pada regio ekson 2 lokus HLA-DRB1 menyebabkan perubahan presentasi peptida antigen kepada reseptor sel T. Terdapat hubungan polimorfisme lokus HLA dengan jumlah CD4 sebagai indikator infeksi dan pertahanan humoral. Mutasi pada HLA-DRB1 adalah salah satu faktor genomik dari karies gigi yang memiliki peran penting dalam jalur imunogenetik pada patogenesis karies gigi (Senpuku & Yumiko, 2004; Ndung'u *et al.*, 2005; Abbas & Lichtman, 2007; Van Wallace, 2010).

Penetapan profil risiko karies pada anak-anak diharapkan mampu memperkirakan risiko seorang anak terhadap karies. Identifikasi faktor risiko genetik adalah langkah potensial untuk pengembangan peranti pemeriksaan yang sensitif. Pemahaman pada genetika kerentanan atau ketahanan seseorang terhadap karies akan mengembangkan pandangan baru tentang proses karies secara individual dan mendasari pengembangan strategi pencegahan karies. Identifikasi faktor risiko karies gigi secara genetik selanjutnya dapat digunakan untuk pengembangan alat deteksi risiko karies dengan sensitifitas tinggi (Balakrishnan *et al.*, 2000; van Ginkel *et al.*, 2000; Leone & Oppenheim, 2001; Li & Wang, 2002; Wright & Hart, 2002; Senpuku & Yumiko, 2004; Harris *et al.*, 2009).



Penelitian ini bertujuan untuk menyusun kit diagnostik untuk analisis genotip HLA-DRB1 pada sampel dengan skala kecil menggunakan pemeriksaan *allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction* (ASO-PCR). Metode ini dipilih karena memungkinkan untuk menguji sampel menggunakan beberapa primer normal dan mutan secara simultan dalam waktu singkat. Desain kit diagnostik ini adalah metode pemeriksaan yang sederhana, cepat, murah untuk mendukung pemeriksaan varian HLA-DRB1. Jika varian HLA-DRB1 pada seorang penderita telah diketahui maka dapat digunakan untuk penegakan diagnosa, penyusunan rancangan perawatan preventif serta rancangan perawatan klinis karies gigi.

Pencegahan dan perawatan karies gigi pada anak-anak membutuhkan kit diagnostik berbasis imunogenetik yang mampu memberikan informasi risiko seorang anak terhadap karies gigi. Jika diagnosa karies gigi dapat ditegakkan maka rancangan perawatan preventif karies gigi yang sesuai untuk tiap individu dapat ditegakkan sedini mungkin. Penelitian ini di titik beratkan pada Pengembangan kit diagnostik karies gigi berbasis imunogenetik melalui metode *allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction* (ASO-PCR) dengan probe oligonukleotida HLA-DRB1 untuk menegakkan diagnosa pre-symptomatik penderita dengan risiko karies atau resisten karies.

Tingginya angka *def-t* pada anak-anak terutama anak-anak di negara berkembang dan negara industri menimbulkan keprihatinan bagi peneliti. Saat ini prediksi dan identifikasi karies hanya dapat dilakukan jika gigi telah erupsi melalui pemeriksaan kavitas lesi karies. Karies gigi sebagai penyakit multi faktorial membutuhkan deteksi di tingkat molekuler untuk mengetahui polimorfisme spesifik HLA-DRB1 dan perubahan berbagai biomarker dalam rangka modifikasi arah pendekatan untuk penentuan perawatan atau penegakan prognosa. Penelitian ini dilakukan untuk menyusun metode diagnosa karies gigi melalui pendekatan imunogenetik. Jika prediksi karies gigi yang akan terjadi pada anak-anak mampu dilakukan melalui pemeriksaan yang tidak invasif, maka pencegahan dapat dilakukan bahkan sebelum gigi permanen erupsi. Hal ini sangat efisien untuk merancang tindakan preventif dan panduan arah terapi karies gigi.

Berdasar peta jalan penelitian Universitas Airlangga, penanggulangan penyakit tropis dan infeksi memerlukan penelitian molekuler pada imunogenitas host. Karies gigi adalah salah satu penyakit infeksi rongga mulut yang membutuhkan pengembangan kit diagnostik untuk menurunkan angka kejadian karies gigi terutama pada anak-anak. Karies gigi merupakan penyakit

yang rongga mulut dengan angka penderita tertinggi, terutama di negara berkembang dan negara industri

Rencana strategis penelitian Universitas Airlangga mengemukakan isu strategis tentang biosensor untuk diagnosa penyakit. Pemecahan masalah yang di rancang untuk hal ini adalah identifikasi dan karakterisasi target molekul untuk diagnostika penyakit sindroma metabolik, degeneratif, penyakit infeksi, keganasan auat autoimun. Hasil akhir dari pemecahan masalah tersebut adalah pengembangan biosensor berbasis DNA. Penelitian yang diusulkan ini mampu mendukung capaian Rencana Strategis Perguruan tinggi melalui Penyusunan kit diagnostik oligonukleotida HLA-DRB1 sebagai salah satu metode pemecahan masalah penyakit infeksi di rongga mulut. Diharapkan diagnostik presimptomatik karies gigi menggunakan metode ini mampu menurunkan indeks karies gigi terutama pada anaka-anak.

Luaran penelitian yang terkait dengan penelitian adalah Prototipe kit diagnostik imunogenetik karies gigi HLA-DRB1varian (DRB\*1209) , dengan metode ASO-PCR. Kit diagnostik ini bersifat tidak invasif, asimptomatik dan dapat di aplikasikan pada sampel skala kecil sehingga lebih ekonomis. Uji stabilitas probe oligonukleotida HLA-DRB1 normal (DRB\*1209) , mutan DRB\*1209(1), dan mutan DRB\*1209(2), mutan DRB\*1209(1), dan mutan DRB\*1209(2) bertujuan untuk menjaga kualitas kit diagnostik saat berada di tangan konsumen. Protokol genotyping HLA-DRB1 menggunakan metode ASO-PCR adalah metode yang sederhana dan mudah dengan menggunakan kit spesifik untuk populasi Indonesia.

Publikasi ilmiah pada jurnal internasional dari penelitian ini diharapkan mampu meningkatkan posisi Universitas Airlangga sebagai World Class University. Paten dari penelitian ini akan menjamin perlindungan atas kekayaan intelektual dalam pengembangan kit diagnostik ini. Buku referensi yang kami susun pada tahun akhir penelitian ini adalah salah satu media untuk masyarakat awam dan peneliti untuk memahami peta jalan penelitian ini lebih detail dan dapat menjadi acuan bagi peneliti yang lain. Presentasi oral pada seminar internasional dan nasional tentang temuan baru yang kami peroleh pada penelitian ini diharapkan mampu mengabarkan dan menyebar luaskan temuan baru ini untuk membuka kerjasama bagi pengembangan lebih lanjut kit diagnostik ini. Teknologi tepat guna yang kami kembangkan memalui penelitian ini adalah protokol pemeriksaan risiko karies gigi pada anak-anak menggunakan kit diagnostik oligonukleotida HLA-DRB1.

Sinergi antar kelompok penelitian dibangun untuk menghasilkan inovasi ini diantaranya pengembangan metode isolasi DNA bekerjasama dengan Departemen Biokimia Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Desain oligonukleotida dan alignmen DNA kami kerjakan bekerjasama dengan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Sain dan Teknologi Universitas Airlangga. Pengambilan sampel pada penelitian ini bekerjasama dengan Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dan Departemen Pedodontia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Analisis statistik dilakukan oleh Departemen Ilmu Kesehatan Gigi Masyarakat Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Deskripsi etnisitas sampel kami lakukan bekerjasama dengan Jurusan Antropologi Ragawi Fakultas Ilmu Sosial dan Ilmu Politik Universitas Airlangga.

Pentingnya riset ini untuk mendukung capaian renstra penelitian Universitas Airlangga adalah untuk menghasilkan penelitian molekuler patogenesis yang diarahkan pada karakterisasi molekuler pada agent yang berinteraksi dengan host.

Pada penelitian ini kami mengembangkan metode genotyping dalam skala kecil agar pemeriksaan rutin dengan sampel dalam jumlah kecil dapat segera terlayani untuk pemeriksaan genotyping HLA-DRB1 tanpa menunggu sampel terkumpul hingga jumlah besar. Tiap varian HLA-DRB1 menunjukkan titer sIgA yang berbeda dan jalur imunogenetik yang berbeda pula. Kit diagnostik ini berbasis metode ASO-PCR, dengan oligoprobe HLA-DRB1 normal dan mutan. Metode ASO-PCR adalah metode yang sederhana, cepat dan ekonomis dan diperkirakan hanya membutuhkan waktu 5 jam per sampel sejak sampel darah diterima di laboratorium untuk memeriksa *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP). Bagian akhir dari rangkaian penelitian ini adalah uji stabilitas oligoprobe HLA-DRB1 terhadap suhu dan lama penyimpanan



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Karies Gigi

Karies gigi adalah demineralisasi jaringan gigi yang bersifat kronis, disebabkan oleh produksi asam hasil fermentasi karbohidrat oleh bakteri kariogenik yang berpotensi menurunkan pH saliva. Diet tinggi karbohidrat terutama sukrosa berpotensi menurunkan pH *biofilm* di permukaan gigi hingga mencapai pH optimum pertumbuhan mikroorganisme *Streptococcus Mutans* (*S. Mutan*). Metabolisme karbohidrat oleh bakteri kariogenik menyebabkan kolonisasi bakteri pada permukaan gigi. Produksi asam hasil fermentasi karbohidrat oleh kolonisasi bakteri menyebabkan kerusakan kristal hidroksi apatit sehingga komponen enamel dan dentin pada jaringan keras gigi mengalami demineralisasi (Marcotte dan Lavoie, 1998; Balakrishnan *et al.*, 2000; Burt & Pai, 2001; Gao *et al.*, 2009).

Beberapa peneliti melaporkan terdapat empat faktor yang berhubungan secara langsung dengan perkembangan karies gigi yaitu inang, bakteri di dalam *biofilm* rongga mulut, diet dan waktu. Empat faktor tersebut dipengaruhi oleh saliva sebagai sistem pertahanan mukosa. Genetika inang mengendalikan imunitas mukosa dan anatomi serta morfologi gigi seperti mineralisasi dentin dan enamel (Townsend *et al.*, 2003; Pinkham, 2005; Stephanopoulos *et al.*, 2005; Selwitz *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2009; Haruyama *et al.*, 2009).

Karies gigi adalah penyakit rongga mulut yang umum terjadi pada masa anak-anak. Di Amerika Serikat karies gigi menempati urutan atas dari rata-rata prevalensi penyakit. Di Indonesia 52,3% penderita karies gigi berusia diatas 10 tahun dan belum ditangani. Data Survei Kesehatan Nasional (Surkenas) 1998 menunjukkan penyakit gigi mengganggu produktifitas 62,4% penduduk Indonesia selama 3,86 hari dalam setahun. Profil risiko karies pada anak-anak dapat digunakan untuk memprediksi apakah seorang anak akan mengalami kerusakan gigi berat di masa dewasa (Lehner, 1996; Slayton *et al.*, 2005).

Gigi yang telah erupsi dilapisi oleh lapisan glikoprotein, terikat irrevesibel pada permukaan gigi dan disebut pelikel permukaan (*acquired pellicle*). Materi ini berperan sebagai reseptor kolonisasi mikroorganisme rongga mulut. Mikroorganisme yang melekat pada permukaan pelikel membentuk plak gigi. Bakteria rongga mulut terutama spesies *Streptococcus* dan *Actinomyces* berada dalam pelikel dan membentuk plak. *S. Mutans* mensintesa enzim *glukosiltransferase* (GTF)

membentuk polisakarida ekstraseluler atau glukon dari sukrosa. Koloni mikroorganisme dalam rongga mulut yang dilapisi glukon dapat menurunkan peran saliva sebagai pelindung dan antibakteri pada plak. Plak menghambat difusi asam dalam saliva, sehingga terjadi lokalisasi produk asam konsentrasi tinggi pada permukaan enamel. Asam bereaksi dengan kristal apatit dan menghancurkan membran enamel dan menyebabkan dekalsifikasi dentin yang disebut karies gigi. Dekalsifikasi mengakibatkan kerusakan jaringan keras gigi dan membentuk rongga tempat tumbuh mikroorganisme, sehingga produksi asam meningkatkan dan demineralisasi berlangsung terus menerus (Indrawati, 2006; Marraffini *et al.*, 2006).

Rongga mulut dilapisi oleh epitel yang berfungsi sebagai barrier fisik terhadap infeksi. Antigen kariogenik dalam rongga mulut dikenali oleh sel dendritik yaitu sel Langerhans yang berperan sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC). Sel dendritik ditemukan pula di area organ limphoid perifer. Sel dendritik pada epitel ini belum mampu menstimulai limfosit T. Sel dendrit ini memiliki membran reseptor tempat ikatan mikroba. Membran reseptor berfungsi untuk menangkap antigen dalam stimulasi reaksi imun alami melalui ikatan *Toll-like reseptor* (TLR) pada sel dendrit, sel epitel dan makrofag dalam jaringan. Proses ini diinduksi oleh *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dan *Interleukin-1* (IL-1). Kombinasi sitokin dan *signaling* TLR mengaktifasi sel dendrit, menghasilkan berbagai perubahan fenotip dan fungsi respon imunitas (Horst *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2010).

*S. Mutans* dalam rongga mulut mengaktifasi sel fagosit untuk memfagosit mikroorganisme. Reseptor sel T mengenali peptida antigen dari *S. Mutans* yang dipresentasikan oleh molekul HLA-DRB-1 ke sel T-CD4<sup>+</sup>. Sekresi sitokin mengaktifasi sel B pada respon imun humoral berinteraksi dengan antigen, berdiferensiasi menjadi sel plasma untuk mensekresi antibodi yaitu sIg A dan Ig G (Abbas *et al.*, 2010; Larson *et al.*, 2010).

Temperatur dalam rongga mulut relatif konstan yaitu 34-36<sup>0</sup>C dan pH rongga mulut dipertahankan mendekati harga normal sekitar 6,76-7,25 oleh saliva. pH tersebut merupakan pH optimum untuk pertumbuhan mikroorganisme. Produk asam dinetralisir melalui pertahanan saliva melalui aktifitas kapasitas bufer saliva. Penurunan pH saliva memperkuat interaksi antigen dari *S. mutans* dengan reseptor pelikel permukaan gigi dan mendukung pertumbuhan berbagai varietas mikroorganisme (Marcotte & Lavoie, 1998)

Plak gigi dibentuk oleh aliran saliva dan kapasitas bufer saliva, dan merupakan media kolonisasi dan agregasi bakteri kariogenik. Plak terbentuk dari 70-80% mikroorganisme dan 20-30% matriks plak. Matriks plak merupakan glukukan, suatu polisakarida ekstraseluler yang terbentuk dari aktivitas gen *gtf* yang mensintesis enzim GTF. Glukan berperan dalam perlekatan *S. mutans* melalui jalur *sucrosa dependent* yang bersifat *irreversible*. Komponen plak gigi terdiri dari mikroorganisme kariogenik, periodontopatogen dan bahan immunosupresi yang mampu meningkatkan respon imun inang selama proses karies. sIgA berperan sebagai penghambat kolonisasi *S. mutans* secara *in vitro*. Hal ini diduga karena sIgA menghambat kerja GTF sehingga glukukan tidak terbentuk, mengakibatkan hambatan perlekatan kuman pada mekanisme pembentukan plak gigi. sIgA dalam saliva sebaliknya tidak menyebabkan kematian *S. mutans* (Jaspersgaard *et al.*, 2002; Nobbs *et al.*, 2009).

## 2.2 Imunogenetik Karies Gigi

Sistem imunitas mukosa didominasi oleh satu *isotype* immunoglobulin yaitu sekretori IgA (sIgA) yang berperan besar pada imunitas adaptif dan imunitas alami. Sejumlah 70-75% dari seluruh immunoglobulin yang diproduksi oleh mamalia adalah IgA. (Macpherson *et al.*, 2000; Macpherson & Uhr, 2004).

Rasio IgA dan IgG dari sekresi glandula parotis ke dalam kavitas oral 500 kali lebih besar dibanding sekresi di dalam serum. Densitas IgA plasma sel di glandula parotis 2-3 kali lebih tinggi dibanding densitas IgA di glandula labial dan submandibula sehingga tampak jelas bahwa IgA berperan penting pada mikrobiologi oral (Brandtzaeg, 2007).

Immunoglobulin A (IgA) adalah antibodi yang diproduksi di jaringan limfoid mukosa, disalurkan secara aktif melalui epitel, dan berikatan dengan mikroba untuk menetralkan mikroba yang menyerang organisme melalui organ mukosa. Antibodi yang disekresi di epitel berikatan dengan mikroba untuk mencegah pembentukan kolonisasi mikroba pada inang dan tipe imunitas ini disebut imunitas mukosa atau *secretory immunity* (Kindt *et al.*, 2006).

Sel dendritik akan mengekspresikan reseptor permukaan yang spesifik berbentuk kemokin (*cytokine chemoattracting*) pada nodus limfatik apabila sel dendritik pada epitel yang teraktifasi oleh antigen tidak mampu mengikat antigen di epitel. Kemokin ini mengarahkan sel dendritik pada

epitel untuk bermigrasi melalui pembuluh limfatik ke nodus limfatik untuk melindungi epitelium (Kolls *et al.*, 2008).

Sel dendritik yang telah dewasa didesain untuk mampu menangkap antigen ke dalam APC dalam stimulasi sel T selama proses migrasi. Kematangan ini ditandai dengan peningkatan sintesa dan ekspresi molekul MHC yang stabil, sehingga mampu mempresentasikan peptida antigen ke sel T dan molekul lain yang disebut ko-stimulator untuk meningkatkan respon sel T (Mestecky *et al.*, 2005).

Antigen yang melekat pada epitel dan memasuki jaringan ikat atau organ parenkim selanjutnya ditangkap oleh sel dendritik yang berada di jaringan dan dibawa ke nodus limfatik. APC mempresentasikan peptida antigen ke CD4<sup>+</sup> T helper dan berperan pada awal respon CD8<sup>+</sup> sel T terhadap antigen dari intraseluler (Abbas *et al.*, 2010).

Paparan antigen pada mukosa mengaktifkan sel T dan sel B untuk menghantarkan induksi aktivasi efektor mukosa. Sistem imun mukosa mengaktifkan antigen-spesifik pada efektor mukosa di lokasi paparan awal antigen. Jalur ini disebut jalur respon antibodi sIgA di mukosa yang dimediasi oleh sel B dan sel T (Ogra *et al.*, 1999).

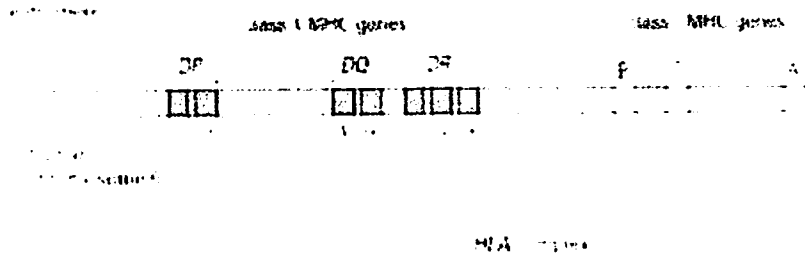
Sel T dalam keadaan normal bermigrasi ke kompartemen sistemik. Pengenalan antigen-spesifik di sel T pada kompartemen sistemik akan mempercepat respon proteksi mukosa (Ksander & Streilein, 1990; van Ginkel *et al.*, 2000).

### 2.3 Oligonukleotida HLA-DRB1

Molekul HLA adalah nama untuk MHC pada manusia. *Superlocus* ini mengandung sejumlah besar gen yang berhubungan dengan fungsi sistem imun pada manusia. Kelompok gen ini terdapat di kromosom 6. Lokus HLA-DRB1 sebesar 266 bp terletak pada nukleotida 136-402 pada gen HLA (*gene bank Reference Sequence: NM\_002124.2*). Molekul MHC diketahui merupakan lokus genetik yang berperan besar pada cangkok jaringan antar individu. Individu yang identik pada lokus MHC akan mampu menerima cangkok jaringan dari individu lain dan sebaliknya. (Hornick & Rose, 2006)

Pada semua spesies, lokus MHC terdiri dari dua set gen yang sangat polimorfik. Gen ini mengkode molekul MHC klas I dan klas II yang berperan pada penyajian peptida antigen ke sel

T. Komposisi sub unit molekul klas I dan klas II berbeda, tetapi keseluruhan struktur keduanya sangat similar (Kindt *et al.*, 2006).



Gambar 2.1 Lokus HLA-DRB1 dari MHC kelas II pada kromosom 6 manusia (Alberts *et al.*, 2002).

Diversitas pada molekul MHC terjadi antar spesies dan antar individu. Variabilitas ini menyebabkan diversitas antibodi dan sel T reseptor, tetapi pemicu diversitas pada molekul MHC tidak selalu sama. Antibodi dan reseptor sel T dikendalikan oleh berbagai proses somatik. Pembentukan reseptor sel T dan sel B bersifat dinamis dan berubah tiap waktu pada tiap individu. Ekspresi molekul MHC yang diekspresi secara individual bersifat tetap di dalam gen dan tidak berubah seiring waktu. Diversitas MHC pada suatu spesies menyebabkan polimorfisme, sehingga terdapat lokus ganda pada suatu lokus genetik. Diversitas MHC pada suatu individu bukan hanya disebabkan oleh perubahan lokus pada suatu gen tetapi juga disebabkan oleh duplikasi gen (Boehm, 2006).

### 2.3.1. Morfologi HLA-DRB1

Molekul HLA memiliki perbedaan lokus yang besar pada tiap lokus dan diketahui sebagai gen paling polimorfik pada vertebrata bahkan 350 lokus dari lokus DRB1 telah ditemukan. Gen kelas II bergabung membentuk reseptor protein heterodimer ( $\alpha\beta$ ) yang diekspresikan di permukaan *antigen presenting cells* (APC). Molekul MHC kelas II mayor terdiri dari HLA-DP, HLA-DQ dan HLA-DR. HLA-DP terdiri dari rantai- $\alpha$  yang disandi oleh lokus HLA-DPA1 dan rantai  $\beta$  yang disandi oleh lokus HLA-DPB1. HLA-DQ terdiri dari rantai- $\alpha$  yang disandi oleh lokus HLA-DQA1 dan rantai  $\beta$  yang disandi oleh lokus HLA-DQB1. HLA-DR terdiri dari rantai- $\alpha$  yang disandi oleh lokus HLA-DRA dan 4 rantai  $\beta$ , disandi oleh lokus-lokus HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5. (Kindt *et al.*, 2006).



### 2.3.2 Polimorfisme HLA-DRB1

Diversitas lokus pada MHC klas I dan II sangat ekstensif dengan ribuan lokus yang telah ditemukan. Polimorfisme HLA-DRB1 terjadi pada suatu populasi melalui seleksi keseimbangan, terutama seleksi pola patogenitas pada perkembangan heterosigot. Hal ini menunjukkan bahwa penyakit yang berhubungan dengan HLA berbeda pula pada tiap kelompok etnik. Penelitian pada beberapa kelompok etnik yang berbeda menyimpulkan bahwa lokus HLA-DRB1 yang menjadi petanda kerentanan suatu penyakit pada suatu kelompok etnik dengan kelompok etnik lain (Wright & Hart, 2002).

### 2.3.3 Hubungan Polimorfisme HLA dan Risiko Karies

Antibodi berperan dalam imunitas dan berhubungan dengan HLA. Penelitian Brandtzaeg (2007) membuktikan bahwa kadar tinggi sIgA berhubungan dengan penurunan karies gigi. Kadar antibodi tinggi pada sIgA ini berhubungan dengan penurunan koloni *S. mutans* pada saat awal kolonisasi (Nogueira *et al.*, 2005).

Hipotesis ini berdasar pada interaksi sIgA dengan epitop adesi dari bakteri kariogenik misalnya PaC, GTF, atau GBP. Fungsi sIgA adalah menghambat adhesi, opsonisasi, fagositosis dan penghancuran oleh neutrofil sehingga antigen *S. mutans* tidak mampu merusak permukaan gigi dan membentuk karies gigi. Imunitas tubuh melawan karies gigi harus mampu menghambat adhesi bakteri kariogenik atau mampu melakukan agregasi terhadap *S. mutans* sehingga pembentukan lesi karies dapat dicegah (Fontana *et al.*, 2000).

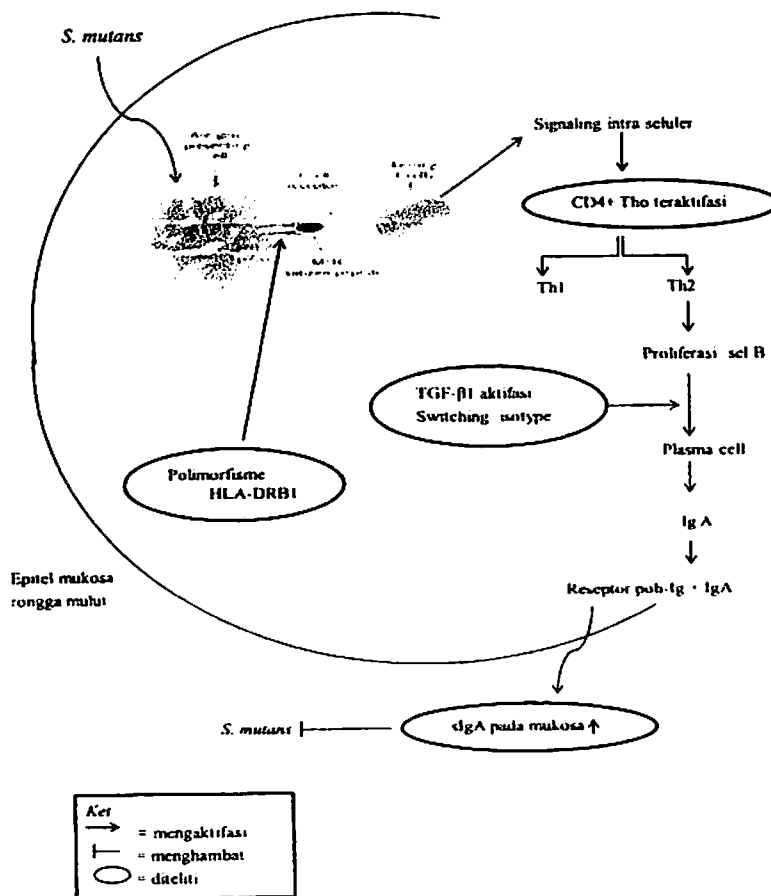
## 2.4 Penelitian yang telah dilaksanakan

Pada penelitian jalur imunogenetik karies gigi ini kami telah melakukan:

1. Analisis genotip HLA-DRB1 pada pasien karies gigi dan bebas karies gigi melalui metode RFLP (Risbin Iptekdok DepKes RI, 2009)
2. Analisis Single Nucleotide polymorphism gen HLA-DRB1 melalui sekuensing DNA (Hibah Bersaing, Dirjen Dikti Kemendikbud RI, 2010)
3. Analisis jumlah *Streptococcus mutans* pada penderita karies gigi dan bebas karies gigi. (Hibah Bersaing, Dirjen Dikti Kemendikbud RI, 2010)

4. Pengukuran titer sIgA pada penderita karies gigi dan bebas karies gigi. (Hibah Bersaing, Dirjen Dikti Kemendikbud RI, 2011)
5. Analisis bioinformatika melalui superimpose tiga dimensi HLA-DRB1. (Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi, Dirjen Dikti Kemendikbud RI, 2013)
6. Ekspresi TGF- $\beta$ 1 pada lamina propria gingiva penderita karies gigi dan bebas karies gigi. (Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi, Dirjen Dikti Kemendikbud RI, 2014 )

Conceptual mapping





**BAB III****TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN****3.1. Tujuan Jangka Pendek**

1. Menyusun oligoprobe varian DRB\*1209, DRB\*1209(1), DRB\*1209(2), DRB\*1209(3) dan DRB\*1209(4) normal dan mutan
2. Merancang protokol diagnostik varian HLA-DRB1 melalui metode ASO-PCR
3. Menguji validitas kit diagnostik pada kelompok penderita karies dan bebas karies pada kelompok sampel yang belum diketahui varian genotip HLA-DRB1
4. Melakukan uji stabilitas oligonukleotida 4 varian HLA-DRB1 terhadap suhu dan lama penyimpanan

**3.2. Tujuan Jangka Panjang**

1. Penelitian ini bertujuan untuk menyusun kit diagnostik untuk analisis genotip HLA-DRB1 pada sampel dengan skala kecil menggunakan pemeriksaan *allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction* (ASO-PCR). Metode ini dipilih karena memungkinkan untuk menguji sampel menggunakan beberapa primer normal dan mutan secara simultan dalam waktu singkat.
2. Desain kit diagnostik ini adalah metode pemeriksaan yang sederhana, cepat, murah untuk mendukung pemeriksaan varian HLA-DRB1. Jika varian HLA-DRB1 pada seorang penderita telah diketahui maka dapat digunakan untuk penegakan diagnosa, penyusunan rancangan perawatan preventif serta rancangan perawatan klinis karies gigi.

**3.3. Manfaat Penelitian**

1. Saat ini prediksi dan identifikasi karies hanya dapat dilakukan jika gigi telah erupsi melalui pemeriksaan kavitas lesi karies. Karies gigi sebagai penyakit multi faktorial membutuhkan deteksi di tingkat molekuler untuk mengetahui polimorfisme spesifik HLA-DRB1 dan perubahan berbagai biomarker dalam rangka modifikasi arah pendekatan untuk penentuan perawatan atau penegakan prognosa.
2. Penelitian ini dilakukan untuk menyusun metode diagnosa karies gigi melalui pendekatan imunogenetik. Jika prediksi karies gigi yang akan terjadi pada anak-anak

mampu dilakukan melalui pemeriksaan yang tidak invasif, maka pencegahan dapat dilakukan bahkan sebelum gigi permanen erupsi.

3. Hal ini sangat efisien untuk merancang tindakan preventif dan panduan arah terapi karies gigi.
4. Hasil akhir penelitian ini diharapkan mampu berperan positif pada peta jalan penelitian Universitas Airlangga yaitu penanggulangan penyakit tropis dan infeksi dan mendukung Rencana strategis penelitian Universitas Airlangga untuk mengemukakan isu strategis tentang biosensor untuk diagnosa penyakit

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah observasional analitik. Penelitian ini menggunakan metode eksplorasi laboratorium secara eksperimental, dilakukan untuk menguji hipotesis melalui beberapa tahapan penelitian:

1. Desain oligonukleotida normal dan mutan berdasar sekuen varian DRB\*1209, DRB\*1209(1) dan DRB\*1209(2)
2. Amplifikasi DNA dengan metode ASO-PCR
3. Validasi oligonukleotida HLA-DRB1 varian DRB\*1209, DRB\*1209(1) ; DRB\*1209(2); DRB\*1209(3) dan DRB\*1209(4) untuk rancang bangun Kit diagnostic imunogenetik karies gigi dengan metode RT-ASO-PCR
4. Menyusun Protokol diagnosa presymptomatik karies gigi menggunakan kit diagnostik oligonukleotida HLA-DRB1 dengan metode ASO-PCR
5. Luaran: Publikasi ilmiah jurnal nasional terakreditasi ; Publikasi ilmiah jurnal internasional; Paten sederhana; Hak cipta; Buku monografi; Presentasi oral pada seminar internasional; Keynote speaker pada seminar nasional; Teknologi tepat guna; Prototype oligoprobe HLA-DRB1 varian (DRB\*1209) , DRB\*1209(1), dan DRB\*1209(2)

#### 4.2 Metode penelitian

##### 1. Koleksi Sampel

Sampel pada tahun pertama adalah sampel yang telah diketahui varian HLA-DRB1. Subyek sampel adalah siswa SD usia 6-9 tahun yang telah menjadi subyek sampel pada masa analisis varian genomik HLA-DRB1. Peripheral blood mononuclear cells diambil sebanyak 1 cc. Sampel pada tahun ke II adalah pasien karies gigi dan bebas karies gigi yang datang ke Rumah Sakit Gigi dan Mulut FKG Universitas Airlangga.

##### 2. Ekstraksi DNA

Pengambilan darah dilakukan pada vena kubiti sebanyak 2 cc, ditampung dalam Vacutainer EDTA. Dilakukan pemisahan *buffy coat* dan serum. *Buffy coat* untuk pemeriksaan

HLA-DRB1. Pemeriksaan DNA genom dilakukan melalui ekstraksi DNA menggunakan metode *simple and rapid genomic DNA* (Suhartati, 2006). Dilakukan amplifikasi DNA pada ekson 2 HLA-DRB1 sebesar 266bp. Hasil isolasi DNA dilakukan pemeriksaan kemurnian dan konsentrasi DNA. Hasil pemeriksaan ini selanjutnya digunakan sebagai acuan penentuan jumlah DNA pada amplifikasi lokus HLA-DRB1 melalui PCR menggunakan primer *Forward primer DRB1*: 5' CAC GTT TCT TGG AGT ACT CT 3' dan *Reverse primer DRB1*: 5' CCG CAC TGT GAA GCT CT 3'.

### 3. Desain oligonukleotida HLA-DRB1

Probe Oligonukleotida DRB\*1209(1), DRB\*1209(2), DRB\*1209(3) dan DRB\*1209(4). (First Base, Singapore), dengan urutan identik sesuai Single Nucleotide Polymorphism HLA-DRB1 yang diperoleh dari hasil sekuensing DNA digunakan dalam penelitian ini. Dalam setiap uji probe sekuen normal digunakan sebagai kontrol positif dan sekuen mutan digunakan sebagai perlakuan pada sampel.

### 4. Amplifikasi DNA melalui ASO-PCR

Tabung mikrosentrifus steril dengan selubung es, dimasukkan campuran reagen sbb: Master mix sebesar 25 µl dan Forward primer oligonukleotida DRB\*1209(1), DRB\*1209(2), DRB\*1209(3) dan DRB\*1209(4) sebesar 3 µM bersama Reverse primer oligonukleotida DRB\*1209(1), DRB\*1209(2), DRB\*1209(3) dan DRB\*1209(4) sebesar 3 µM, ditambah Water, PCR-grade sebanyak 10 µl hingga dicapai volume total 45 µl, ditambah Template DNA 5 µl hingga Total volume (per reaksi) 50 µl. Denaturasi 1 putaran pada 95°C selama 2 menit, denaturasi 94°C 30 detik, Annealing 60°C 30 detik, Elongation 72°C selama 30 detik, hingga dicapai total cycle 30x, Final Extension 1x 72°C selama 10 menit, suhu dipertahankan 4°C. Produk PCR diidentifikasi secara elektroforesis pada gel agarose 2% dalam TBE menggunakan DNA marker VIII (Roche) sebesar 50 bp. Lalu didokumentasi menggunakan polaroid.

### 5. Uji stabilitas oligoprobe terhadap waktu penyimpanan dan uji stabilitas suhu penyimpanan

Uji ini bertujuan mengetahui stabilitas probe oligonukleotida jika kit ini telah diproduksi massal melalui kerjasama industry. Uji stabilitas waktu penyimpanan dilakukan pada

2 bulan, 4 bulan dan 6 bulan penyimpanan pada berbagai suhu yang berbeda yaitu  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $21^{\circ}\text{C}$  dan  $-20^{\circ}\text{C}$ .



## BAB V

### HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

#### 5.1 Jumlah CD4 pada kelompok bebas karies varian DRB\*1209 dan DRB\*1209(1) dan kelompok penderita karies gigi DRB\*1209(2), DRB\*1209(3) dan DRB\*1209(4)

Dari total 60 subjek penelitian, 30 subjek penelitian di kelompok kasus terdiri dari 11 laki-laki dan 19 perempuan dengan rerata usia 93,3 bulan ( 7,7 tahun ). 30 subjek penelitian pada kelompok kontrol terdiri dari 11 laki-laki dan 19 perempuan dengan rerata usia 95,33 bulan ( 7,9 tahun ).

Pengukuran jumlah CD4 absolut untuk menjelaskan peran sel T dalam sinyal transduksi dilakukan menggunakan flowcytometry Analisa hasil CD4 menggunakan software MultiSET V2.2. Hasil rerata pengukuran CD 4 tampak pada table 5.1. Data jumlah CD4 pada kelompok kasus dan kontrol berdistribusi normal. Hasil analisis dengan uji t terdapat perbedaan bermakna rerata jumlah CD4 pada kelompok kasus dan kontrol ( $p=0,000$ ). Rerata CD4 pada kelompok kasus sebesar 587,07 cells/UL lebih rendah dibanding rerata CD4 pada kelompok kontrol sebesar 1028,32 cells/UL.

Tabel 5. 1. Jumlah CD4 (sel/UL) pada kelompok kasus dan kelompok kontrol

Kelompok	n	CD4				t-test
		Rerata	SD	Minimal	Maksimal	
Kontrol	30	1028,6	189,32	734	1587	$t=11,729$
Kasus	30	587,07	81,64	450	745	$p=0,000$

Perbandingan berdasar varian HLA-DRB1 pada seluruh sampel menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kadar sIgA dan CD4 pada kelompok kasus dan kontrol. Rerata kadar sIgA, CD4 antar varian HLA-DRB1 pada kelompok kontrol terdapat perbedaan bermakna. Rerata kadar sIgA,CD4 antar varian HLA-DRB1 pada kelompok kasus terdapat perbedaan bermakna. Perbedaan rerata sIgA dan CD4 serta signifikansi pada tiap kelompok sampel tampak pada table 5.2

Tabel 5.2 Perbedaan kadar sIgA dan CD4 pada kelompok kasus dan kontrol

Kelompok	Varian HLA	CD4	
		Rerata±SD	p
Kontrol	DRB*1209	757±19	0,151
	DRB*1209(1)	1083±157	
Kasus	DRB*1209(2)	555±59	0,362
	DRB*1209(3)	676±56	
	DRB*1209(4)	532±39	

Perbandingan berdasar varian HLA-DRB1 pada seluruh sampel menunjukkan perbedaan yang signifikan pada jumlah CD4 antara kelompok kasus dan kontrol. Peran HLA-DRB1 sebagai molekul yang mempresentasikan peptida antigen kepada sel T reseptor digunakan sebagai dasar tinjauan untuk mengetahui perbedaan jumlah CD4. Apabila varian HLA tertentu mampu menyandi sIgA tinggi berarti HLA tersebut mampu mempresentasikan peptida antigen dengan baik. (Ndung'u, et al., 2005; Manasa et al., 2007). Konsep ini digunakan untuk membahas ikatan DRB\*1209 dan DRB\*1209(1) yang menghasilkan sekresi sIgA kadar tinggi.

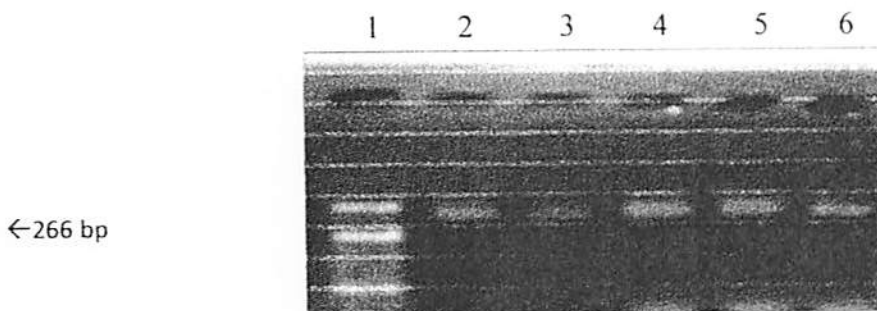
Untuk mengetahui perbedaan kekuatan presentasi peptida antigen antara DRB\*1209 dan DRB\*1209(1), maka dilakukan analisis bioinformatika melalui Bio Edit. Pada analisis ini tampak perbedaan kedua varian HLA-DRB1, yang terletak pada perubahan residu asam amino D (Aspartat) pada DRB\*1209 berubah menjadi H (Histidin) pada DRB\*1209(1) karena terjadi substitusi nukleotida pada nukleotida 295(G->C).

Perbedaan kemampuan presentasi antigen pada varian DRB\*1201 dan DRB\*1405 dapat dijelaskan melalui pendekatan teori ikatan kimiawi, dimana Aspartat pada DRB\*1209 yang bermuatan negative, berperan sebagai pengikat bagian peptida antigen yang bermuatan positif. SNP pada residu asam amino DRB\*1209 mengakibatkan Aspartat berubah menjadi Histidin yang bermuatan positif pada polipeptida DRB\*1209(1), sehingga peptida antigen yang bermuatan positif tidak dapat diikat oleh DRB\*1209(1) karena terjadi tolak-menolak. Maka dapat dipahami jika jumlah CD4 pada DRB\*12019 lebih tinggi dibanding DRB\*1209(1) berdasarkan pendekatan yang telah diuraikan. (Nelson & Cox, 2008)

Varian HLA-DRB1 pada kelompok kasus yaitu DRB\*1209(2), DRB\*1209(3) dan DRB\*1209(4) memiliki jumlah CD4 dengan rerata 587,07 sel/UL, lebih rendah dibanding rerata CD4 pada kelompok kontrol yaitu 1028,57 sel/UL. Maka jelas bahwa varian DRB\*1209 dan DRB\*1209(1) yang tidak mengalami frameshift dan Premature Termination Codons (PTC) dapat mempresentasikan peptida antigen lebih baik, sehingga menghasilkan jumlah CD4 lebih tinggi.

## 5.2 Isolasi DNA, amplifikasi lokus HLA-DRB1 dan elektroforesis

Pemeriksaan polimorfisme HLA-DRB dilakukan melalui isolasi DNA dari sampel darah. Pengambilan darah dilakukan pada vena cubitii sebanyak 1 cc, ditampung dalam Vacutainer EDTA. Dilakukan pemisahan *buffy coat* dan serum. *Buffy coat* untuk pemeriksaan genomik HLA-DRB1. Isolasi DNA menggunakan metode *simple and rapid genomic DNA* (Suhartati, 2006) Hasil isolasi DNA dilakukan pemeriksaan kemurnian dan konsentrasi DNA, selanjutnya pemeriksaan ini digunakan sebagai acuan penentuan jumlah DNA yang digunakan pada amplifikasi DNA melalui PCR. Elektroforesis dilakukan untuk mengetahui letak ampikon HLA-DRB pada 266 bp dengan marker DNA sebesar 100 bp, tampak pada gambar 5.1



Gambar 5.1 Elektroforesis ampikon PCR lokus HLA-DRB1 pada 266 bp. baris 1 adalah marker DNA 100 bp. Baris 2-6 adalah sampel.

Dari penelitian sebelumnya telah diketahui susunan nukleotida dan asam amino lokus HLA-DRB1. Diperoleh 5 kelompok varian seperti tampak pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Susunan nukleotida dan asam amino HLA-DRB1 pada 5 varian sampel.

No	Varian HLA-DRB1	Susunan Nukleotida
1	DRB1*1209(1)	TTC TTC AAT GGG ACG GAG CGG GTG CGG TTA CTG GAG AGA CAC TTC CAT AAC CAG GAG GAG CTC CTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG TTC CGG GCG GTG ACG GAG CTG GGG CGG CCT GTC GCC GAG TCC TGG AAC AGC CAG AAG GAC TTC CTG GAA CAC AGG CGG GCC GCG GTG GAC ACC TAT TGC AGA CAC AAC TAC GGG GCT GTG GAG AGC TTC ACA GTG CAG CGG
2	DRB1*1209(2)	TTT CTC ATG CGA CGG ACG GGT GCG GTT ACT GGA GAG ACA CTT CCA TAA CCA GGA GGA GCT CCT GCG CTT CGA CAG CGA CGT GGG GGA GTT CCG GGC GGT GAC GGA GCT GGG GCG GCC TGT CGC CGA GTC CTG GAA CAG CCA GAA GGA CTT CCT GGA AGA CAG GCG CGC CGC GGT GGA CAC CTA TTG CAG ACA CAA CTA CGG GGC TGT GGA GAG CTT CAC AGT GCA GCG
2	DRB1*1209(3)	TTT CTC ATG CGA CGG AAC GGT GCG GTT ACT GGA GAG ACA CTT CCA TAA CCA GGA GGA GCT CCT GCG CTT CGA CAG CGA CGT GGG GGA GTT CCG GGC GGT GAC GGA GCT GGG GCG GCC TGT CGC CGA GTC CTG GAA CAG CCA GAA GGA CTT CCT GGA AGA CAG GCG CGC CGC GGT GTT CAC CTA TTG CAG ACA CAA CTA CGG GGC TGT GGA GAG CTT CAC AGT GCA GCG G
4	DRB1*1209(4)	TTT TTT TCA TGG GAC GGA ACG GTG CGG TTA CTG GAG AGA CAC TTC CAT AAC CAG GAG GAG CTC CTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG TTC CGG GCG GTG ACG GAG CTG GGG CGG CCT GTC GCC GAG TCC TGG AAC AGC CAG AAG GAC TTC CTG GAA GAC AGG CGC GCC GCG GTT GTC ACC TAT TGC AGA CAC AAC TAC GGG GCT GTG GAG AGC TTC ACA GTG CAG CGG TTT TTT AGT GCA GCG GAG AGC TTC ACA GTG CAG GCC AAA GCT TCC AAG TGC ACC CCC CCC CCC CCC CCG TGC AGC GG

Hasil penyejajaran sekuen sampel menunjukkan terdapat mutasi yaitu substitusi dan delesi. Mutasi substitusi terjadi pada kelompok varian DRB\*1209(1) pada nukleotida (nt) yaitu nt295 (G→C) dan nt303 (C→G).

Delesi ditemukan pada 3 kelompok varian yaitu kelompok varian DRB\*1209(2) dan DRB\*1209(3) pada nt13(T→-) dan nt153(G→-), sedangkan pada kelompok varian DRB\*1209(4) terdapat delesi pada nt153(G→-). Delesi ini menyebabkan *frameshift mutation*

dan *Premature Termination Codons* (PTC) pada ketiga sampel tersebut.

Mutasi yang terjadi pada tingkat DNA tersebut menyebabkan perubahan urutan asam amino. Perubahan asam amino pada kelompok varian DRB\*1209(1) terjadi pada kodon(cd) yaitu cd9(D→H). Delesi pada kelompok varian DRB\*1209(2), DRB\*1209(3) dan DRB\*1209(4) menyebabkan *frameshift mutation* dan kodon stop lebih awal. Pada kelompok varian DRB\*1209(2) dan DRB\*1209(3) tampak stop kodon pada polipeptida ke 61 sedangkan pada kelompok varian DRB\*1209(4) tampak stop kodon pada polipeptida ke 79. Frekwensi polimorfisme pada tiap kelompok varian ditampilkan pada tabel 4.3

Tabel 4.3 Frekuensi polimorfisme nukleotida pada tiap varian HLA-DRB pada kelompok kasus dan kontrol

HLA-DRB1	Mutasi substitusi pada nukleotida	Delesi	Perubahan asam amino
DRB*1209(1)	nt295 (G→C), nt303(C→G)	-	cd99(D→H)
DRB*1209(2)		136(T→-) 153(G→-)	<i>Frame shift dan Premature stop codon</i> pada kodon ke 61
DRB*1209(3)	nt313 (G→T), nt314(A→T)	136(T→-) 153(G→-)	<i>Frame shift dan Premature stop codon</i> pada kodon ke 61
DRB*1209(4)	nt312 (G→T), nt314 (A→T)	153(G→-)	<i>Frame shift dan premature stop codon</i> pada kodon ke 79

#### 5.4 Desain Probe Oligonukleotida

DNA probe adalah suatu fragmen DNA atau protein pelacak target gen. DNA probe yang telah dilabel akan berkomplementasi dengan target melalui hibridisasi sehingga dapat mendeteksi keberadaan gen tertentu. Terdapat dua macam probe, yaitu homologus dan heterologus. Homologus adalah probe yang diperoleh dari DNA dengan sumber yang sama dengan DNA yang akan dilacak sehingga ikatan komplemen probe dengan DNA target cenderung lebih kuat dan presisi. Sedangkan heterologus adalah probe diperoleh dari sumber

organisme yang berbeda atau dibuat secara sintetik sehingga ikatannya kurang presisi dengan gen target. (Furuya, 2005).

Probe dapat juga dibuat dari oligonukleotida (biasanya terdiri dari 30-40 nukleotida) yang dibuat secara sintetik. Oligonukleotida tersebut dapat berupa fragmen DNA rantai tunggal atau fragmen RNA yang dilabel.

Probe adalah sekuens nukleotida single strand pendek (kira-kira 15-32 bp) yang komplemen dengan DNA target yang biasa digunakan untuk mendeteksi dan menganalisa keberadaan penyakit yang menginfeksi tubuh kita. Probe adalah agen yang dimasukkan kedalam sebuah medium untuk mendapatkan informasi tentang struktur maupun substansi tertentu. Probe memungkinkan kita untuk memvisualisasikan struktur DNA dan juga mendeteksi kelainan-kelainan yang ada pada suatu DNA. teknik pendeteksian DNA target dengan menempelkan probe yang komplemen dan di deteksi langsung pada sampel tersebut.

Probe yang baik harus mengandung 45-60 % nukleotida G dan C dan hanya sepanjang 15-32 bp. Hal ini dilakukan untuk menjaga kestabilan probe tersebut. Selain itu, probe ini juga harus spesifik dan komplemen hanya terhadap DNA target, dan sebisa mungkin tidak saling komplemen dengan probe itu sendiri ataupun membentuk struktur sekunder. Apabila probe saling berkomplemen, akan menyebabkan mispriming; dan apabila probe kurang spesifik, akan menyebabkan bukan hanya DNA target yang akan terdeteksi.

Mekanisme pembuatan probe untuk mendeteksi mutasi gen HLA-DRB1:

1. Mendeteksi adanya mutasi pada gen ataupun kodon pada HLA-DRB1 yang menyebabkan perbedaan titer sIgA pada penderita karies gigi, ditemukan adanya mutasi berupa perubahan asam amino cd99(D→H), *Frame shift* dan *Premature stop codon* pada kodon ke 61, *Frame shift* dan *premature stop codon* pada kodon ke 79
2. Mencari sekuens gen HLA-DRB1\*1209 yang telah termutasi kemudian mengambil 32 nukleotida secara acak yang memiliki bagian spesifik yang telah termutasi.
3. Mencocokkan sekuens yang telah dipilih dengan melakukan BLAST sampai perbedaan nukleotidanya dinilai cukup besar kurang lebih > 6 basa.
4. Melakukan komplemen dan reverse dari sekuens HLA-DRB1 terdelesi yang telah dipilih untuk membuat probe.

## 5.2 Analisis bioinformatika in silico oligoprobe HLA-DRB1 normal dan mutan

Untuk mengidentifikasi situs hibridisasi HLA-DRB1 menggunakan pasangan primer *Forward primer* DRB1: 5' CAC GTT TCT TGG AGT ACT CT 3' dan *Reverse primer* DRB1: 5' CCG CAC TGT GAA GCT CT 3'.

Penentuan wilayah gen HLA-DRB yang tepat bahwa primer atau probe saling melengkapi, ditetapkan menggunakan perangkat lunak BLASTn software terhadap versi teks statis dari urutan keberpihakan DRB1 ekson 2, tersedia dari IMGT / HLA database

### 5.2 PCR-SSOP assay untuk HLA-DRB1 (1209)

kami merancang probe khusus pr16a (5'TCCTGGAAGACAGG3 ') dan pr16b (5'TCCTGGAGGACAGG3'). Amplifikasi awal menggunakan pasangan primer DRB amp-2 / DRB amp-B

### 5.3 PCR-SSOP untuk genotyping HLA-DRB\*1209(1), DRB\*1209(2), DRB\*1209(3), serta DRB\*1209(4).

Pada penelitian ini di desain 4 probe untuk genotyping HLA-DRB\*1209(1), DRB\*1209(2), DRB\*1209(3), serta DRB\*1209(4).

### 5.4 PCR SSOP assay untuk deteksi SNP

Untuk merancang primer yang memperkuat SNP yang terkait dengan perbedaan sekresi sIgA, kita memperoleh data dari SNP database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/> versi terbaru dari urutan DNA yang di perkirakan terjadi SNP dan setelah itu digunakan perangkat lunak Primer-blast. Pada penelitian ini kami merancang probe sebesar 21 bp dengan SNP di tengah-tengah. Pemeriksaan hibridisasi probe menggunakan perangkat lunak Blast.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

1. Penyusunan oligoprobe HLA-DRB1 sebagai kit deteksi dini karies gigi pada anak perlu pengujian lebih lanjut untuk menyusun protocol pengujian validitas kit diagnostik pada kelompok penderita karies dan bebas karies pada kelompok sampel yang belum diketahui varian genotip HLA-DRB1

#### 7.2 SARAN

Untuk mengejar target waktu penyelesaian penelitian ini maka dukungan dana penelitian perlu diperhatikan

#### 7.2 Saran

Segera melakukan validasi protokol ASO PCR untuk pemeriksaan polimorfisme HLA-DRB1

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA



IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
A.Y. ...

## DAFTAR PUSTAKA

- Altun, C., Guven, G., Orkunoglu, F., Cehreli, Z.C., Karaaslan, A., Basak, F., Akbulut, E., 2008. Human leukocyte antigen class II alleles and dental caries in a child population, *Pediatr Dent*, 30:154-159
- Bagherian, A., Nehmatollahi, H, Afshari, J.T., Moheghi, N., 2008. Comparison of allele frequency for HLA-DR dan HLA-DQ between patients with ECC and caries free children, *J Indian Soc Pedod Prevent Dent*, 28: 18-21.
- Balakrishnan M, Simmonds R, Tagg JR, 2000. Dental Caries is Preventable Infectious Disease. *Australian Dental Journal* 45: 235-245.
- Bratthal, 1996. Dental caries in European. *J Oral Science* 4: 607-13
- D.J. Smith , 2002, Dental caries vaccines: prospect and concern, *Crit Rev Oral Biol Med* 13(4):335-349
- Gronroos L, 2000. Quantitative and Qualitative Characterization of Mutans Streptococci in saliva and in the dentition, Academic Dissertation the faculty of Medicine of the University of Helsinki, Helsinki.
- Ichiro Takahashi, Kenji Matsushita, Nobuo Okahashi, Michael W. Russel, Yuji Suzuki, Eisuke Munekata, Toshihiko Koga, 1992, Genetic Control of Immune Responses in Mice to Synthetic Peptides of a Streptococcus mutans Surface Protein Antigen, *Infection and Immunity*, American Society for Microbiology, Feb. 1992, p. 623-629 Vol. 60, No. 2
- Indrawati, R, 2006. Aktivitas enzim dextranase dan sebaran genotype Streptococcus mutans penderita karies dan bebas karies, Disertasi, Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Surabaya
- Jespergaard C, Hajishengallis G, Greenway T, Smith DJ et al, 1999. Fungsional and immunogenic Characterization of two Cloned Regions of Streptococcus mutans Glucosyltransferase I, *J. Infect and Imm* 2:810-16
- Joewono Soeroso, 2004, Asosiasi HLA-DRB dan HLA-DQB1 Dengan Arthritis Reumatoid, Disertasi, Program Pasca sarjana Universitas Airlangg, Surabaya
- J. T. Wright, D.D.S., M.S.; T. C. Hart, D.D.S., Ph.D. 2002. The Genome Projects: Implications for Dental Practice and Education. *Journal of Dental Education Volume 66, May, No. 5.* 659-671
- Kinane D.F dan Hart T.C, 2003, Gene and Gene Polymorphisms Associated With Periodontal Disease, *Crit Rev Oral Biol Med*, 14(6):430-449
- Kindt, T.J. Osborne, B.A. Goldsby, R.A. 2006. Kuby Immunology. 6<sup>th</sup> ed. WH Freeman & Co

- Lehner T, 1996. *Immunology of Oral Disease* ( Farida dan Suryadana alih bahasa ) *Imunologi pada penyakit mulut*, Ed.3, Jakarta :EGC presss, hal 61-89
- Mestecky, J., Lamm, M.E., Strober, W., Bienenstock, J., McGhee, J.R., Mayer, L. 2005. *Mucosal Immunology*, 3th ed. Elsevier, Inc
- Nariyama, M., Shimizu, K., Uematsu, T., and Maeda, T., 2004. Identification of chromosomes associated with dental caries susceptibility using quantitative trait locus analysis in mice, *Caries Res*, 38:79-84.
- Okahashi N. et al, 1993. *Mol. Microbiol (USA)*, Blackwell Scientific Publications, 3, p.221-228
- Rasmussen, T., Hansson, L., Österborg, A., Johnsen, H. E., & Mellstedt, H. (2003). Idiotypic vaccination in multiple myeloma induced a reduction of circulating clonal tumor B cells. *Blood*, 101(11), 4607-4610.
- Senpuku H., Yumiko, M., 2004. Method for examining the caries risk, United States Patent 20040132071.
- Shuler, C.F., 2001. Inherited risks for susceptibility to dental caries, *Journal of Dental Education*, 65:1038-1045.
- Senpuku et al, 1995. An antigenic peptide inducing cross-reacting antibodies inhibiting the interaction of *Streptococcus mutans* PAc with human salivary components. *Infect Immun (USA)*, Baltimore Md. American Association of immunologists, 63, p.4695-4703.
- Senpuku et al, 1998. Identification of *Streptococcus mutans* P Ac peptide motif binding with human MHC class II molecules (DRB\*0802, \*1101, \*1401, and 1405) *Immunology (England)*, Blacwell Scientific Publication, 95. p. 322-330
- Senpuku et al, 2001. Inhibitory Effects of MoAbs against a Surface Protein Antigen in Real-Time Adherence *In vitro* and Recolonization *In vivo* of *Streptococcus mutans*. *Scand J. Immunol (England)*, Oxford Blackwell Sciebtific Publications, 54. p.109-116
- Takahiko, O., Yoshihisa, Y., 2006. Salivary agglutinin that interacts with *Streptococcus mutans* surface protein antigen is a risk marker for dental caries, *Journal of Dental Health*, 56: 228-232.
- Takahashi I. et al, 1991. Immunogenicity and protective effect against oral colonization by *Streptococcus mutans* of synthetic peptides of a *Streptococcus* surface protein antigen. *J. Immunol, USA*. 146, p. 332-6
- Takahashi I. et al, 1992. *Infect Immun (USA)*, Baltimore Md. American Association of Immunologists. 60, p.623-629
- Takahiko Oho, Yoshihiro Shimazaki, Morihide Mitoma, Mamiko Yoshimura, Yoshihisa Yamashita, Kaoru Okano, Yutaka Nakano, Hiroko Kawagoe, Masataka Fukuyama.

Noboru Fujihara and Toshihiko Koga, 1999, Bovine Milk Antibodies  
 against Cell Surface Protein Antigen PAC- Glucosyltransferase Fusion  
 Protein Suppress Cell Adhesion and Alter Glucan Synthesis of *Streptococcus*  
*mutans*, J. Nutr. 129: 1836-1841, 1999

R. L. Slayton, M.E. Cooper, and M.L. Marazita, 2005, Tuftelin, Mutans streptococci, and  
 Dental Caries Susceptibility, J Dent Res 84(8):711-714,

Regianne U. Kamiya, Marcelo H. Napimoga, Jose' F. Ho' fling and Reginaldo B.  
 Gonc,alves, 2005. Frequency of four different mutacin genes in *Streptococcus*  
*mutans* genotypes isolated from caries-free and caries-active  
 individuals, Journal of Medical Microbiology, 54, 599-604

R. L. Slayton, M.E. Cooper, and M.L. Marazita, 2005, Tuftelin, Mutans Streptococci, and  
 Dental Caries Susceptibility. J Dent Res 84(8):711-714, 711-714

Thomas C. Hart, D.D.S., Ph.D.; Robert E. Ferrell, Ph.D. 2002. Genetic Testing  
 Considerations for Oral Medicine. Journal of Dental Education Volume 66,  
 No. 10, 1195-1202

LAMPIRAN

DRAFT PATEN

**MEKANISME IMUNOGENETIK SEKRESI sIgA PADA BERBAGAI VARIAN HLA-DRB1 BERDASAR JUMLAH CD-  
 4 SEBAGAI RISIKO KARIES GIGI PADA POPULASI JAWA DI SURABAYA**

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berkaitan dengan mekanisme imunogenetik sekresi sIgA pada berbagai varian HLA-DRB1 berdasar jumlah CD-4 sebagai risiko karies gigi pada populasi Jawa di Surabaya.

### Latar Belakang Invensi

Faktor genetik dan lingkungan diduga berperan pada peningkatan risiko karies gigi. Penelitian sebelumnya membuktikan terdapat hubungan antara aspek genetik dan respon imunitas terhadap karies gigi. Faktor genetik inang berpengaruh terhadap pengenalan antigen, respon imunitas dan pola diet. Penelitian pada manusia dan hewan membuktikan perbedaan genetik menyebabkan penyimpangan imunomodulator terhadap antigen yang berperan pada karies gigi,

Eliminasi antigen kariogenik melibatkan respon imun alami dan respon imun adaptif. *Major Histocompatibility Complex (MHC)* berperan dalam imunitas seluler untuk merangsang sistem imunitas melalui presentasi antigen kepada reseptor sel T. MHC pada manusia dikenal dengan *Human Leucocyte Antigen (HLA)*. HLA klas II adalah rangkaian lokus genetik yang terdiri dari 3 lokus polipeptida yaitu DP, DQ dan DR. Lokus DR terdiri dari satu rantai alfa dan dua rantai beta. Lokus HLA-DRB1 menyandi rantai beta fungsional dan bersifat sangat polimorfik. HLA klas II adalah lokus dengan polimorfisme tinggi pada berbagai mamalia. Polimorfisme ini menyebabkan perbedaan ikatan peptida sehingga mempengaruhi progresi dan kerentanan suatu penyakit secara fungsional. HLA-DRB1 mempresentasikan antigen dari *Antigen Presenting Cell (APC)* kepada CD4+ sel T. Jumlah CD4 adalah indikator klinis utama dari kompetensi kekebalan tubuh serta berperan dalam penentuan diagnosa dan terapi. CD4+sel T menghasilkan sitokin yaitu *interleukin-2 (IL-2)* untuk aktifasi dan diferensiasi sel T *helper* menjadi subset sel efektor yaitu sel Th 1 dan sel Th2. IL-4 dari Th2 berperan pada stimulasi produksi antibodi oleh sel B. Th2 mengaktifasi proliferasi sel B, menyebabkan sel membelah menjadi sel B memori dan sel B efektor yang disebut sel plasma. Antibodi yang disekresi oleh plasma sel adalah molekul efektor mayor dari imunitas humoral. TGF- $\beta$ 1, IL-6 dan IL-5 mengaktifasi sel B melalui sistem MALT (*Mucosa-associated Lymphoid Tissue*) untuk melakukan *switching isotype* pada *membran-bound antibody* dari *Imunoglobulin M (IgM)* menjadi *Imunoglobulin A (IgA)*. Transport IgA menembus epitel mukosa terjadi melalui ikatan reseptor poli-Ig dan IgA. Reseptor ini mengikat IgA, melakukan endositosis dan menyalurkan ke permukaan lumen. Reseptor tersebut dipecah oleh protease dan sIgA dilepaskan ke dalam lumen dengan tetap membawa reseptor *poli-Ig*.

### Ringkasan Invensi

Invensi ini menyediakan hubungan varian-varian baru HLA-DRB1 pada populasi Jawa di Surabaya, dengan jumlah CD4 yang berhubungan dengan tingkat keparahan karies gigi. Varian HLA-DRB\*1209 dan

HLA-DRB\*1209(1) berhubungan dengan karies gigi risiko rendah dan HLA-DRB\*1209(2), HLA-DRB\*1209(3), HLA-DRB\*1209(4) berhubungan dengan karies gigi risiko tinggi

### Uraian Lengkap Invensi

Mutasi regio ekson 2 lokus HLA-DRB1 berkaitan dengan patogenesis karies gigi, karena perubahan susunan asam amino pada regio ekson 2 lokus HLA-DRB1 menyebabkan perubahan presentasi peptida antigen kepada reseptor sel T. Terdapat hubungan polimorfisme lokus HLA dengan jumlah CD4 sebagai indikator infeksi dan pertahanan humoral. Mutasi pada HLA-DRB1 adalah salah satu faktor genomik dari karies gigi yang memiliki peran penting dalam jalur imunogenetik pada patogenesis karies gigi.

Berikut diuraikan tahapan invensi yang dilakukan. Dari total 60 subjek penelitian, 30 subjek penelitian di kelompok kasus terdiri dari 11 laki-laki dan 19 perempuan dengan rerata usia 93,3 bulan ( 7,7 tahun ). 30 subjek penelitian pada kelompok kontrol terdiri dari 11 laki-laki dan 19 perempuan dengan rerata usia 95,33 bulan ( 7,9 tahun ).

Pengukuran jumlah CD4 absolut untuk menjelaskan peran sel T dalam sinyal transduksi dilakukan menggunakan *flowcytometry* Analisa hasil CD4 menggunakan *software MultiSET V2.2*. Hasil rerata pengukuran CD 4 tampak pada table 1. Data jumlah CD4 pada kelompok kasus dan kontrol berdistribusi normal. Hasil analisis dengan uji t terdapat perbedaan bermakna rerata jumlah CD4 pada kelompok kasus dan kontrol ( $p=0,000$ ). Rerata CD4 pada kelompok kasus sebesar 587,07 cells/UL lebih rendah dibanding rerata CD4 pada kelompok kontrol sebesar 1028,32 cells/UL.

Tabel 1. Jumlah CD4 (sel/UL) pada kelompok kasus dan kelompok kontrol

Kelompok	n	CD4				t-test
		Rerata	SD	Minimal	Maksimal	
Kontrol	30	1028,6	189,32	734	1587	t=11,729
Kasus	30	587,07	81,64	450	745	p=0,000

Perbandingan berdasar varian HLA-DRB1 pada seluruh sampel menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kadar sIgA dan CD4 pada kelompok kasus dan kontrol. Rerata kadar sIgA, CD4 antar varian HLA-DRB1 pada kelompok kontrol terdapat perbedaan bermakna. Rerata kadar sIgA,CD4 antar varian HLA-DRB1 pada kelompok kasus terdapat perbedaan bermakna. Perbedaan rerata sIgA dan CD4 serta signifikansi pada tiap kelompok sampel tampak pada table 2

Tabel 2 Perbedaan kadar sIgA dan CD4 pada kelompok kasus dan kontrol

Kelompok	Varian HLA	sigA		CD4	
		Rerata±SD	p	Rerata±SD	p
Kontrol	DRB*1209	341±42	0,118	757±19	0,151
	DRB*1209(1)	521±78		1083±157	
Kasus	DRB*1209(2)	151±57	0,786	555±59	0,362
	DRB*1209(3)	246±31		676±56	
	DRB*1209(4)	112±42		532±39	

Perbandingan berdasar varian HLA-DRB1 pada seluruh sampel menunjukkan perbedaan yang signifikan pada jumlah CD4 antara kelompok kasus dan kontrol. Peran HLA-DRB1 sebagai molekul yang mempresentasikan peptida antigen kepada sel T reseptor digunakan sebagai dasar tinjauan untuk mengetahui perbedaan jumlah CD4. Apabila varian HLA tertentu mampu menyandi sigA tinggi berarti HLA tersebut mampu mempresentasikan peptida antigen dengan baik. (Ndung'u, et al., 2005; Manasa et al., 2007). Konsep ini digunakan untuk membahas ikatan DRB\*1209 dan DRB\*1209(1) yang menghasilkan sekresi sigA kadar tinggi.

Untuk mengetahui perbedaan kekuatan presentasi peptida antigen antara DRB\*1209 dan DRB\*1209(1), maka dilakukan analisis bioinformatika melalui *Bio Edit*. Pada analisis ini tampak perbedaan kedua varian HLA-DRB1, yang terletak pada perubahan residu asam amino D (Aspartat) pada DRB\*1209 berubah menjadi H (Histidin) pada DRB\*1209(1) karena terjadi substitusi nukleotida pada nukleotida 295(G→C).

Perbedaan kemampuan presentasi antigen pada varian DRB\*1201 dan DRB\*1405 dapat dijelaskan melalui pendekatan teori ikatan kimiawi, dimana Aspartat pada DRB\*1209 yang bermuatan negative, berperan sebagai pengikat bagian peptida antigen yang bermuatan positif. SNP pada residu asam amino DRB\*1209 mengakibatkan Aspartat berubah menjadi Histidin yang bermuatan positif pada polipeptida DRB\*1209(1), sehingga peptida antigen yang bermuatan positif tidak dapat dilkat oleh DRB\*1209(1) karena terjadi tolak-menolak. Maka dapat dipahami jika jumlah CD4 pada DRB\*12019 lebih tinggi dibanding DRB\*1209(1) berdasarkan pendekatan yang telah diuraikan. (Nelson & Cox, 2008)

Varian HLA-DRB1 pada kelompok kasus yaitu DRB\*1209(2), DRB\*1209(3) dan DRB\*1209(4) memiliki jumlah CD4 dengan rerata 587,07 sel/UL, lebih rendah dibanding rerata CD4 pada kelompok kontrol yaitu 1028,57 sel/UL. Maka jelas bahwa varian DRB\*1209 dan DRB\*1209(1) yang tidak mengalami *frameshift* dan *Premature Termination Codons* (PTC) dapat mempresentasikan peptida antigen lebih baik, sehingga menghasilkan jumlah CD4 lebih tinggi.

Beberapa penelitian menjelaskan hubungan antara antigen dan HLA dalam patogenesis penyakit, dengan metode yang menyerupai dengan salah satu pendekatan berikut. Pendekatan pertama HLA lemah

dalam mempresentasikan peptida virus atau antigen bakteri. Pendekatan kedua diperkirakan terdapat *binding sites* khusus pada permukaan sel T untuk mengikat virus atau bakteri. Pendekatan ketiga diduga tersedia jalur transportasi khusus untuk peptida antigen bakteri sehingga memungkinkan untuk dikenali oleh sel T. Pendekatan keempat adalah Sel T memiliki kesamaan atau similaritas molekul dengan kuman patogen, sehingga sistem kekebalan tubuh gagal untuk mengenali patogen asing dan gagal membentuk respon imun untuk melawannya. Diperkirakan bahwa semua mekanisme tersebut terlibat dengan tingkat yang bervariasi di berbagai penyakit (Trosby 1997).

Mekanisme *rearrangement* DNA pada HLA berpengaruh terhadap vertebrata melalui dua jalur yang sejaris yaitu sekresi imunoglobulin dan diversitas reseptor sel T. Imunoglobulin dan reseptor sel T adalah protein yang disintesa oleh limfosit B dan limfosit T. Sepanjang masa hidup organisme, sistem imun harus mampu mensintesa berbagai antigen dan harus mampu mensintesa sistem imunitas untuk menghasilkan imunoglobulin dan protein reseptor pada sel T. Pada masa perkembangan awal dari sel B, genom dan lokus imunoglobulin mengalami *rearrangement*. Hal ini menyebabkan perubahan pada segmen gen Vh , segmen gen Dh segmen gen Jh. Hasil akhir dari *rearrangement* ini berupa gabungan segmen VDJ dari protein imunoglobulin. Jika sel B telah matang, maka limfosit ini mengendalikan *class switching*, sehingga menghasilkan berbagai tipe imunoglobulin sesuai sintesa yang dilakukan oleh sel B ( Brown, 2007)

#### Klaim

1. Suatu varian HLA-DRB1, yang ditulis sebagai HLA-DRB\*1209 dan HLA-DRB\*1209(1), berhubungan dengan jumlah CD-4 tinggi dan risiko karies gigi rendah
2. Suatu varian HLA-DRB1, yang ditulis sebagai HLA-DRB\*1209(2), HLA-DRB\*1209(3), dan HLA-DRB\*1209(4), berhubungan dengan jumlah CD-4 rendah dan risiko karies gigi tinggi
3. Varian HLA-DRB1 sebagaimana klaim 1 s.d klaim 2, diperoleh melalui pemeriksaan flowcytometry CD4



## MEKANISME IMUNOGENETIK SEKRESI sIgA PADA BERBAGAI VARIAN HLA-DRB1 BERDASAR JUMLAH CD-4 SEBAGAI RISIKO KARIES GIGI PADA POPULASI JAWA DI SURABAYA

Jumlah CD4 adalah indikator klinis utama dari kompetensi kekebalan tubuh serta berperan dalam penentuan diagnosa dan terapi. Invensi ini bertujuan untuk hubungan perbedaan varian HLA-DRB1 dan jumlah CD-4 sebagai risiko karies gigi pada populasi Jawa di Surabaya. Tahapan yang dilakukan meliputi Pengukuran jumlah CD4 absolut untuk menjelaskan peran sel T dalam sinyal transduksi dilakukan menggunakan *flowcytometry* Analisa hasil CD4 menggunakan *software MultiSET V2.2*. CD4 berpengaruh terhadap signal transduksi karena limfosit CD4 adalah sel target mayor pada berbagai infeksi. Penurunan progresifitas CD4 merupakan awal proses patologis yang terkait dengan infeksi, termasuk destruksi sel imunologi lainnya. Pada penelitian ini diketahui korelasi antara CD4 dan sIgA pada kelompok kasus dan kontrol sangat kuat. Analisis statistik menggunakan analisis jalur menjelaskan bahwa CD4 mempengaruhi sIgA secara tidak langsung. Regulasi sIgA oleh CD4 terjadi melalui pengaruh induksi TGF- $\beta$ 1. Analisis ini sesuai dengan kerangka teori bahwa *switching isotype* pada sel B memori dengan *membran-bound antibody* IgA terjadi melalui pengenalan CD 40 dan aktivasi TGF- $\beta$ 1 terhadap sel B naif dengan *membran-bound antibody* IgM dengan induksi IL-5, IL-6 dan IL-10. *Switching isotype* IgA terjadi pada saat IgA dibutuhkan oleh tubuh untuk eliminasi patogen di mukosa. Hasil penelitian diketahui varian HLA-DRB1 dengan nomenklatur DRB\*1209(2), DRB\*1209(3) dan DRB\*1209(4) berhubungan dengan kadar sIgA rendah dan resiko karies tinggi. Varian DRB\*1209 dan DRB\*1209(1) berhubungan dengan kadar sIgA tinggi dan resiko karies rendah. Penyebab peningkatan resiko karies ini adalah penurunan kekuatan presentasi bakteri karies oleh HLA-DRB1 kepada reseptor sel T. Penurunan kekuatan presentasi pada DRB\*1209(2), DRB\*1209(3) dan DRB\*1209(4) secara kuat berkaitan dengan delesi nukleotida sehingga menyebabkan *frameshift* dan posisi stop kodon maju ke posisi kodon ke 61 pada DRB\*1209(2) dan DRB\*1209(3) serta kodon ke 79 pada DRB\*1209(4), sehingga menyebabkan translasi berhenti lebih awal. *Premature Termination Codons* (PTC) adalah kodon stop yang terbentuk sebelum akhir translasi. Hal ini menyebabkan polipeptida lebih pendek sehingga presentasi peptida antigen ke sel T reseptor tidak sempurna.

**Author PPF Confirmation. Submission ID: 194865**

**From:** Ms Vivienne Gee (viviennegee@dovepress.com)

**To:** pratiwi\_gunawan@yahoo.com

**Date:** Thursday, November 15, 2018, 10:56 PM GMT+7

Dear Dr Soesilawati

Thank you for your submission to Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry, titled "The Role of Salivary sIgA as protection for Dental Caries Activity in Indonesian Children" which we have received today.

If your paper is accepted for publication you will need to pay a publication processing fee. As you are from Indonesia we can offer you a heavily discounted price of USD929.00 (normal price is USD1,958.00) - a discount of USD1,029.00. In order for us to be able to make this offer to more authors we recommend that your submission not exceed 7,500 words.

We have limited funds for such discounts and many authors who would like this discount, so please let me know by 21 Nov 2018 if you accept this special offer. If I do not hear from you by 21 Nov 2018 and you wish to proceed, your paper may be charged the full price of USD1,958.00.

This special discount price is only available to authors who do not have any sponsorship from commercial organizations and is billed to an address within Indonesia. If you have such support or the invoice is addressed outside of Indonesia we require you to pay the full, advertised rate.

Before your manuscript goes to independent peer-review I need to remind you that:

- 1) Your paper should be unique and not published elsewhere. If you have reused or adapted figures, tables or sections of text from papers published elsewhere you must approach the copyright owner (normally the journal publisher and not the author) and obtain their permission to re-use those elements; and
- 2) You agree to pay the publication processing fee of USD929.00 if your paper is accepted for publication (if you have already accepted a discounted price offered to you at the time of submission please be aware that this is the maximum discount and we are unable to help you further); and
- 3) You should advise us immediately if you have received financial or other support from a commercial organization in the preparation of this submission; and
- 4) Your paper should not be under consideration by any other journal or publisher.

For full details of terms and conditions of publication:

[http://www.dovepress.com/submit\\_terms\\_and\\_conditions.php?content\\_id=771](http://www.dovepress.com/submit_terms_and_conditions.php?content_id=771)

Your submission has been received on the basis of your agreement with the terms and conditions which you were asked to consent to during the submission process. These are available in full on the website:  
[http://www.dovepress.com/author\\_guidelines.php?content\\_id=771](http://www.dovepress.com/author_guidelines.php?content_id=771).

Please confirm you agree to these terms and conditions and that you will pay the publication processing fee if your paper is accepted for publication. As soon as we hear from you we will put your manuscript into peer-review.

Regards

Ms Vivienne Gee  
Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry.  
Dove Medical Press Ltd  
(ID: 194865)

## ORIGINAL RESEARCH

Salivary sIgA, Dental Caries Activity, Saliva, Anti-bacterial substance, Immunity of the oral cavity, Children  
Pratiwi Soesilawati et al

### **The Role of Salivary sIgA as protection for Dental Caries Activity in Indonesian Children**

**Pratiwi Soesilawati<sup>1</sup>, Harianto Notopuro<sup>2</sup>, Yuliati<sup>1</sup>, Maretaningtias Dwi Ariani<sup>3</sup>, Muhammad Alwino Bayu<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Department of Oral Biology, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

<sup>3</sup> Department of Prosthodontics, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

<sup>4</sup> Undergraduate student, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya Indonesia

**Correspondence: Pratiwi Soesilawati. Department of Oral Biology, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya, East Java, Indonesia. Telp: +6231 5030255. Email: pratiwi\_gunawan@yahoo.com**

#### **Abstract:**

**The purpose:** This study was to determine the effect of sIgA difference levels as the risk of dental caries. Dental caries risk is controlled by the saliva due to the presence of secretory immunoglobulin A (sIgA) as an anti-bacterial substance. This case-control study was conducted to determine the protective role of salivary secretory immunoglobulin A (sIgA) levels in the stimulated whole saliva of dental caries active and caries free children. **Methods:** This research was done through stimulated whole saliva were collected from children aged 6-9 years with the index *def-t* > 4 of 30 children as the case group and 30 children with *def-t* < 4 as the control group. Saliva

samples were collected in sterile vials between 10-12 AM due to the circadian rhythm, at least one hour after breakfast. 1,5 ml of collected salivary sample then centrifuged at 3.000 rpm, 4°C for 10 minutes, supernatants transferred to other tube and it was transported immediately to the laboratory at a temperature of -20° C. The estimation of sIgA concentration was done using ELISA. The differences in the level of sIgA between the two groups with caries were analysed using the t-test. **Results:** The total salivary concentration of sIgA was statistically significantly higher in the control group than that of case group. **Conclusion:** sIgA levels of the stimulated saliva has some role in protection against dental caries.

**Keywords:** sIgA level, ELISA, Immunology, Dental health in children

## INTRODUCTION

Dental caries is an infectious disease that causes health problems in some developed and developing countries. This disease is the main cause of tooth extraction in children and adults. The prevalence of dental caries in developing countries such as Indonesia and Thailand has shown a sharp increase in the last 20 years. Dental caries has penetrated to all over the world, even developed countries like America and parts of Europe. *The WHO Oral Health Database* declared the index *Decay, Missing, Filling Teeth* (DMFT) of 12-year-olds in 188 countries globally<sup>1-2</sup>.

The risk of dental caries is controlled by saliva due to the presence of *Secretory Immunoglobulin A* (sIgA) as an antibacterial substance. Factors that play a role in the development of dental caries are the host response, bacteria in plaque as antigen, quality and quantity of diet, and time. Genetic and environmental factors are thought to

contribute to an increased risk of dental caries. Previous research has shown that there is a relationship between the genetic aspect and the immune response to dental caries. Genetic factors affect the introduction of antigen, immune response and dietary patterns. Research on humans and animals proves that genetic differences cause immunomodulatory deviations from antigens that play a role in dental caries<sup>3-10</sup>.

Immunity of the oral cavity is controlled by sIgA, *immunoglobulin G (IgG)* and *immunoglobulin A (IgA)*. Mucosal oral cavity is more resistant to irritation and not easily sensitized. sIgA in saliva has the same role as sIgA in the mucosal immune system. The role of sIgA includes viral neutralization, neutralization of toxins, as well as growth and colonization of microorganisms in the epithelium or tooth surfaces<sup>6,11-12</sup>.

Antibodies in the blood capillaries secreted through the *epithelium junctional* toward *gingival crevicular fluid (GCF)*. Salivary antibodies contribute to the immune system in the periodontium and tooth surfaces. Research proves the humoral and cellular defense components of the blood are able to reach the tooth surface through GCF. The immune component in GCF is analogous to the components of immunity in blood serum<sup>11, 13</sup>.

Indonesia shows a high prevalence of dental caries with growth tending to increase. The Household Health Survey (SKRT) in 2004 showed that 39% of Indonesians suffer from dental and oral diseases. This study was conducted to predict the response of mucosal immunity to cariogenic bacteria through measurement of salivary titer in children aged 6-9 years from Java population in Surabaya Indonesia.

## METHODS

The study population is elementary school students in Javanese, aged 6-9 years old in Surabaya. The case population are students with  $def-t \geq 4$  and control population are students with  $def-t < 4$ . The sample was 60 children, it was divided into 30 control group samples and 30 case group samples.

Sampling in elementary school, in all areas of Surabaya, by dividing the municipality into five clusters of Central, West, East, North and South Surabaya based on data from the Ministry of National Education in Surabaya. In each cluster, judgment sample was to obtain in second grade elementary school in each region. Samples of saliva were performed by the researchers on all elementary school students aged 6-9 years who met the inclusion criteria for the test  $def-t$ . The results of measurements  $def-t$  are then used as the basis for determining case and control groups through matching age and sex in the two sample groups.

## RESULTS

Total from 60 research subject, the case group consisted by 30 subject which 11 men and 19 women with the mean of age is 93,3 month (7,7 years old). 30 research subject in the control group contain from 11 men and 19 women with the mean of age is 95,33 month (7,9 years old). Sex and age data distribution in total subject research show the table 1.

Table 1. Distribution of sex and age in case and control groups

Sex	Case	Control
Man	36,7%	36,7%
Woman	63,3%	63,3%
Age (month)	93,33	95,33

### def-t index in case and control group

The *def-t* index is the index that describes the severity of dental caries in the early teeth, measured by WHO standards. The results of intra oral examination in 60 samples showed data as shown in table 2.

Table 2. *Def-t* index in case and control group

Group	n	<i>def-t</i>				Wilcoxon-Mann-Whitney test
		Mean	SD	Minima l	Maxim um	
Control	30	0,7	0,651	0	2	p=0,000
Case	30	4,17	0,592	3	5	

The sample distribution based on the variety of *def-t* index value by intraoral assessment is shown by Table 3. Both groups consist of three different variety of *def-t* index value.

Tabel 3 Distribution of sample on both case and control group according to def-t index.

<i>def-t</i>	Sample Group		$\Sigma$
	Case	Control	
0	0	12	12
1	0	15	15
2	0	3	3
3	3	0	3
4	19	0	19
5	8	0	8
$\Sigma$	30	30	60

### sIgA level on case and control group

The result of sIgA titer assessment through ELISA testing on saliva sample in the case and control group is show in table 4. It shows that sIgA level in the case group (n=30) has a mean value of 168.50 ng/ml. That means it is lower than 300 ng/ml, meanwhile the sIgA on the control group (n=30) has a mean value of 491.33 ng/ml (above 300 ng/ml). Mean values on both groups are corresponding towards literature by Rashkova et al (2009).

Table 4. Mean, deviation standard, minimum, and maximum of SIgA level

Group	n	Mean	sIgA SD	Minimal	Maksimal	t-test
Control	30	491,33	99,77	310	600	t=14,366
Case	30	168,50	72,07	68	300	p=0,000



### Correlation between sIgA and *def-t* index

There is a significant correlation between sIgA level and *def-t* index by -0,839. This correlation value shows an inverse relation between sIgA level and *def-t* index, where the higher the *def-t* value the lower the sIgA level, and vice versa.

Table 5. Correlation between sIgA level and *def-t* index.

	sIgA	<i>def-t</i>	
sIgA	-	-0,875	p=0,000
<i>def-t</i>	-0,875	-	

## DISCUSSION

It has been conducted on 60 subjects who have met the Declaration of Helsinki standard with serum and leukocyte analysis unit of blood, saliva, and gingival tissue. Dental caries is an infectious disease with multifactorial causes that occur in many population developing countries and industrialized countries. Caries is more common in low socioeconomic groups, this is influenced by educational background and opportunities for health care<sup>14</sup>. The etiology of caries is influenced by host, environmental, and time factors. Environmental factors are influenced by the accumulation of oral and dietary bacteria. Host factor is influenced by genetic variation of control of antibody secretion in saliva and genetic variation in locus controlling the formation of hard tissue of teeth including amelogenin, enamelin and tuftelin<sup>15</sup>.

The role of sIgA in the oral cavity is to prevent the adhesion of *S. mutans* to the surface of the tooth. thus glucan is not formed and inhibits the demineralization process of hard tooth tissue. Various studies have shown that low sIgA levels in the oral cavity

has implication to high caries risk, whereas high sIgA levels lead to low caries risk<sup>1, 16-17</sup>.

The correlations relate to the role of saliva in dental caries. The secretion of sIgA from gingival crevicular fluid and the presence of sIgA in saliva play a role in the caries pathogenesis. Salivary gland hypophysis affect saliva flow rate and also affect the development of dental caries. Several studies have reported that treatment with psychopharmaceutical drugs and unregulated diabetes treatment have an effect on the decrease of flow rate saliva<sup>18-20</sup>.

The relationship between carbohydrate diet and dental caries is a difficult factor to predict. If a person consumes large amounts of sugar but at the same time uses fluoride treatment, hence sugar consumption does not cause tooth tissue damage<sup>21-24</sup>.

The history of dental caries in the mother may increase the caries risk in her child and the caries history in the early tooth phase is a prediction of caries in the permanent dental phase<sup>25-29</sup>. Age affects dental caries due to mucosal immunity to cariogenic bacteria played by sIgA in line with body immunity maturity. Measurement of child immunity is recommended over 6 years old because the immune system is thought to be complete at this age<sup>30</sup>.

## CONCLUSION

The total salivary concentration of sIgA was statistically significantly higher in the control group than that of case Group. The study has concluded sIgA levels of the stimulated saliva has some role in protection against dental caries.

## REFERENCES

1. Bratthall. Dental caries in European. *J Oral Science*. 1996;4:607-613.
2. Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *American J Dent*. 2009;21(19):3-8.
3. Acton RT, Dasanayake AP, Harrison RA, Li Y, Roseman JM, Go RCP, Wiener H, Caufield PW. Associations of MHC genes with levels of caries-inducing organism and caries severity in African-American women. *Human Immunology*. 1999;60:984-989.
4. Pinkham JR. Pediatric dentistry: infancy through adolescence St. Louis, Mo.: Elsevier Saunders. 2005.
5. Munns C, Zacharin MR, Rodda CP, Batch JA, Morley R, Cranswick NE, et al. Prevention and treatment of infant and childhood vitamin D deficiency in Australia and New Zealand: a consensus statement. *Med J Aust*. 2006;185(85):268-272.
6. Kindt TJ, Osborne BA, Goldsby RA. Kuby Immunology. Sixth Edition. WH Freeman & Co. 2006:236-341.
7. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007;369(9555):51-59.
8. Barros SP and Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J.Dent Res*. 2009;88(5):400-408.
9. Harris NO, Garcia-Godoy F, Nathe CN. Primary preventive dentistry. Upper Saddle River, N.J.: Pearson. 2009.
10. Robinett CC, Giansanti MG, Gatti M, Fuller MT. TRAPP II is required for cleavage furrow ingression and localization of Rab11 in dividing male meiotic cells of *Drosophila*. *J Cell Sci* 2009;122(24):4526-4534.
11. Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, mcghee JR, Mayer L. Mucosal Immunology. Third Edition. Elsevier. 2005;561-574.
12. Abbas AK and Lichtman AH. Basic Immunology: Function and disorders of the immune system. Second Edition. Elsevier. 2007;47-157.
13. Senpuku H. Inhibitory effects of moabs against a surface protein antigen in real-time adherence in-vitro and recolonization in-vivo of *Streptococcus mutans*. *Scand J Immunol*. 2001;54:109-116.
14. Ettinger RL. Epidemiology of dental caries: a broad review. National Institutes of Health. Diagnosis and management of dental caries throughout life. Bethesda, Md.: National Institutes of Health. *Dent Clin North Am*. 2001;43(4):679-694.
15. Amerongen AN, Ligtenberg AJM, Veerman ECI. Implications for Diagnostics in the Biochemistry and Physiology of Saliva. Special Issue from *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1098(1):1-6.
16. Lehner T. *Imunologi Pada Penyakit Mulut*. Translate by Farida and Suryadana. Ed.3. Jakarta. EGC press. 1996;61-89.
17. Van Wallace MC, Jr. Immunogenetic of dental caries. Dissertation. School of Dentistry, Indiana University, USA. 2010.
18. Fox PC, van der Ven PF, Sonies BC, Weiffenbach JM, Baum BJ. Xerostomia. Evaluation of A Symptom With Increasing Significance. *JADA*. 1985; 110(4):519-525.
19. Navazesh M. Salivary gland hypofunction in elderly patients. *J.Calif Dent Assoc*. 1994;22(3):62-68.
20. Leone CW and Oppenheim FG. Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *J Dent Educ*. 2001;65(10):1054-1062.

21. Burt BA and Pai S. Sugar consumption and caries risk: A systematic review. *J Dent Educ.* 2001;65(10):1017-1023.
22. Tinanoff N and Douglass J. Clinical decision-making for caries management in primary teeth. *J Dent Educ.* 2001;65(10):1133-42.
23. Zero D. 2004. Sugars: the arch criminal?. *Caries Res.* 2004;38(3):277-285.
24. Tsuchi Y, Hanada N, Asano T, Abe T, Yamaguchi S, Salam MA, Nakao R, Takeuchi H. Role of peptida antigen for induction of inhibitory antibodies to streptococcus mutans in the human oral cavity. *Clin Exp Immunol* 2004.
25. Helm S and Helm T. Correlation between caries experience in primary and permanent dentition in birth-cohorts 1950-70. *Scand J Dent Res.* 1990;98(3):225-227.
26. Reich E, Lussi A and Newbrun E. Caries Risk Assessment. *Int Dent J.* 1999; 49(1):15-26.
27. Russell JI, Macfarlane TW, Aitchison TC, Stephen KW and Burchell CK. Prediction of dental caries in Scottish adolescents. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999;19(2):74-77.
28. Li Y and Wang W. Predicting caries in permanent teeth from caries in primary teeth: An eight-year cohort study. *J Dent Res.* 2002;81(8):561-6.
29. Retno Indrawati. Aktivitas enzim dextranase dan sebaran genotype Streptococcus mutans penderita karies dan bebas karies. Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga. Surabaya. 2006;58-72
30. Senpuku H and Yumiko M. 2004. Method for examining the caries risk, United States Patent 20040132071.