

LAPORAN

REDESAIN EKSPLORASI MIKROBA PENGHASIL GLUKANASE BARU PENGHIDROLISIS PLAK GIGI SEBAGAI PENCEGAH KARIES GIGI DAN PERIODONTITIS

IKFA
kk--
LP. 219/110
Bak
r

PROGRAM INSENTIF RISET DASAR

No. Pendaftaran On-Line: RD-2009-991

Fokus Bidang Prioritas: Teknologi Kesehatan dan Obat

Peneliti utama: Dr. Afaf Baktir, M.S., Apt.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Kampus C Unair Jalan Mulyorejo, Surabaya 60115

Telepon: (031)5995246-8, Faksimile: (031)5962066,

Email: lpunair@rad.net.id

November 2009

1. RINGKASAN

Redesain eksplorasi mikroba penghasil enzim glukukanase berdasarkan pada prinsip bahwa keberadaan glukukan plak gigi sebagai satu-satunya sumber C akan menginduksi ekspresi gen penyandi enzim yang dapat menghidrolisis glukukan plak. Melalui paradigma baru ini dapat ditapis beberapa mikroba potensial penghasil enzim glukukanase baru (*novel enzyme*) yang dapat menghidrolisis glukukan plak gigi secara sempurna.

Penapisan mikroba penghasil enzim glukukanase menggunakan substrat glukukan plak gigi telah menemukan 7 koloni bakteri, serta 10 koloni kapang dan ragi. Hasil identifikasi secara biokimia disimpulkan spesies bakteri temuan penghasil enzim glukukanase meliputi: *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter freundii*, *Ochrobactrim anthropi*, *Leconostoc mesenteroides ssp dextranicum*, *Sphingobacterium multivorum*, *Chryseobacterium indilogenes*, dan *Staphylococcus lugdunensis*. Sedang spesies fungi temuan penghasil enzim glukukanase meliputi: *Candida famata*, *Candida lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Candida magnoliae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon osahii* dan *Kodamaea ohmeri*. Tiga di antara isolat temuan belum dapat diungkap melalui identifikasi secara biokimia, karena semua uji yang telah dilakukan tidak menunjukkan kesamaan dengan satupun data yang ada. Diperkirakan tiga isolat tersebut merupakan isolat baru sehingga belum tersedia di *database*.

Tujuan penelitian tahun kedua adalah melakukan produksi skala laboratorium, purifikasi parsial dan karakterisasi masing-masing enzim glukukanase, serta uji daya hambatnya terhadap pembentukan plak gigi secara *in vitro*.

Berdasarkan penapisan isolat temuan lebih lanjut terhadap aktivitas enzim glukukanase α ,1-3 dan α ,1-6, maka telah dipilih 6 isolat untuk dilakukan produksi enzim, karakterisasi dan uji penghambatan terhadap pembentukan plak secara *in vitro*.

Produksi, karakterisasi serta uji aktivitas glukukanase α ,1-3 dan α ,1-6 dari setiap isolat menunjukkan hasil sebagai berikut.

Hasil karakterisasi ekstrak enzim glukonase dari isolat hasil penapisan

Kode isolat	Nama isolat	pH optimum kisaran/puncak	Suhu optimum [°C]	Aktivitas glukonase terhadap substrat dekstran [glukonase α -1,6]	Aktivitas glukonase terhadap substrat glukon plak [glukonase α -1,3]
JC3	<i>Codamaea ohmeri</i>	4-6 / 6	35	0.2194 U/ml	Tidak ada data
JB3	<i>Candida magnolia</i>	6-6 / 6	35	0,2309 U/mL	Tidak ada data
B9	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	6-8 / 7	37	0,0855 U/ml	Tidak ada data
B4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6-8 / 7	37	0,3910 U/ml	0,1207 U/ml
B5	<i>Staphylococcus ingdunensis</i>	6-8 / 8	37	0,4251 U/mL	0,1286 U/mL
B8	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	6-8 / 8	37	0,3965 U/mL	0,1243 U/mL
B7	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	6-8 / 7	37	0,4888 U/mL	0,1294 U/mL

Urutan kekuatan daya hambat pembentukan plak gigi oleh enzim-enzim temuan secara *in vitro*, berdasarkan hal ini maka urutan kekuatan enzim glukonase temuan adalah enzim glukonase dari isolat B7 (*Sphingobacterium multivorum*), B5 (*Staphylococcus lugdunensis*), B4 (*Leuconostoc mesenteroides*), B8 (*Ochrobactrum anthropi*), B2 (*Chryseobacterium indologenes*), B9 (*Citrobacter amalonaticus*).

2. PENDAHULUAN

Indonesia sebagai salah satu pusat keragaman hayati terbesar di dunia memiliki potensi bernilai yang selayaknya dikaji secara intensif, dalam rangka eksplorasi produk-produk unggulan. Mikroorganismen penghasil enzim industri adalah salah satu potensi keragaman hayati Indonesia yang di antaranya berupa enzim yang digunakan untuk mengatasi masalah karies gigi.

Karies gigi merupakan penyakit infeksi yang paling banyak dijumpai, serta penyebab utama hilangnya gigi pada anak-anak maupun orang dewasa. Negara berkembang seperti Zambia, Indonesia, Sudan, Nigeria dan Thailand, menunjukkan peningkatan prevalensi karies

gigi yang tajam (Balakrishnan *et al.*, 2000). Prevalensi karies gigi di negara-negara barat menurun perlahan seiring pemberlakuan fluoridasi air minum disertai pemeliharaan gigi yang benar. Akan tetapi pemakaian fluor secara sinambung dengan cara fluoridasi air minum telah menimbulkan kasus fluorosis dengan penampakan *burik* pada enamel serta efek toksik yang lain (Purwanto, 1996). Selanjutnya cara ini ditinggalkan yang berakibat prevalensi karies gigi di negara-negara maju justru menempati peringkat tertinggi, sebagai tampak dalam peta tingkat prevalensi karies gigi (gambar 1). Peta tersebut menunjukkan bahwa karies gigi telah merambah ke seluruh pelosok dunia, bahkan negara-negara maju seperti Australia, Amerika dan sebagian Eropa menunjukkan angka karies yang sangat tinggi dan tertinggi.

Berdasarkan analisis angka kejadian karies gigi yang telah diuraikan maka dapat dimaklumi bahwa penemuan produk baru yang dapat menghambat karies gigi secara tuntas sangat dinantikan oleh seluruh dunia. Produk demikian mempunyai peluang emas untuk dijadikan komoditi ekspor maupun untuk kebutuhan dalam negeri. Kenyataan ini telah mendorong banyak penelitian tentang produk-produk penghambat karies gigi. Berbagai produk telah dikembangkan untuk mengatasi karies gigi melalui beberapa pendekatan, meliputi (1) pencegahan transmisi *Streptococcus* kelompok mutans (MS) penghasil glukon yang merupakan biang dan faktor virulensi karies gigi, (2) eliminasi populasi MS yang ada di rongga mulut, (3) meningkatkan ketahanan gigi terhadap asam dan (4) kontrol komposisi karbohidrat diet. Akan tetapi angka karies gigi di dunia belum juga dapat ditekan, bahkan terus meningkat seiring dengan berkembangnya ragam produk makanan bergula, terutama di negara maju.

Enzim merupakan suatu komponen biologis yang sangat penting, yaitu berfungsi sebagai biokatalisator dengan daya kerja yang kuat dan bersifat spesifik. Semua perombakan zat makanan dalam organisme hidup hanya dapat terjadi oleh kerja enzim. Kerja enzim sangat efisien, yaitu dapat mempercepat reaksi 10^3 sampai 10^8 kali lebih cepat dibanding dengan tanpa katalis. Satu molekul enzim mampu mengubah 100 sampai 1000 molekul substrat menjadi produk setiap detiknya. Berdasarkan kelebihan sifat enzim maka aplikasinya dalam industri semakin meningkat, terutama enzim mikrobial yang dapat diproduksi dalam jumlah besar, tidak memerlukan area luas dan dalam waktu yang lebih singkat dibanding enzim dari sumber lain.

Enzim yang telah dikembangkan untuk mengatasi karies gigi adalah enzim dekstranase dan mutanase. Kedua enzim ini sangat rasional digunakan sebagai anti karies gigi dengan cara menghidrolisis glukon untuk mencegah pembentukan plak gigi. Namun beberapa laporan

penggunaan enzim dekstranase pada hewan uji belum memberikan hasil yang memuaskan (Lobene *et al.*, 1971). Pemakaian enzim mutanase menunjukkan kemampuan tinggi dalam mereduksi plak gigi, akan tetapi memberikan efek samping berupa gusi berdarah, sakit tenggorokan, pendarahan pada lidah, dan gangguan indra perasa (Inoue *et al.*, 1990). Penggunaan dalam bentuk enzim campuran dekstranase dan mutanase menunjukkan reduksi plak yang memuaskan, yaitu setara dengan pemakaian *chlorhexidine* dan *fluoride*, akan tetapi mutanase tetap perlu diwaspadai penggunaannya terutama dalam jangka panjang. Berdasarkan latar belakang ini maka perlu dilakukan eksplorasi enzim-enzim lain penghidrolisis glukan plak gigi yang memiliki kemampuan mencegah karies gigi tanpa memberikan efek samping.

Tujuan umum

Memperoleh enzim glukanase baru yang memiliki aktivitas unggul dalam menghidrolisis plak gigi secara efektif dan aman, guna menghambat dan mencegah karies gigi dan periodontitis.

Tujuan khusus

Tujuan khusus tahun kedua adalah:

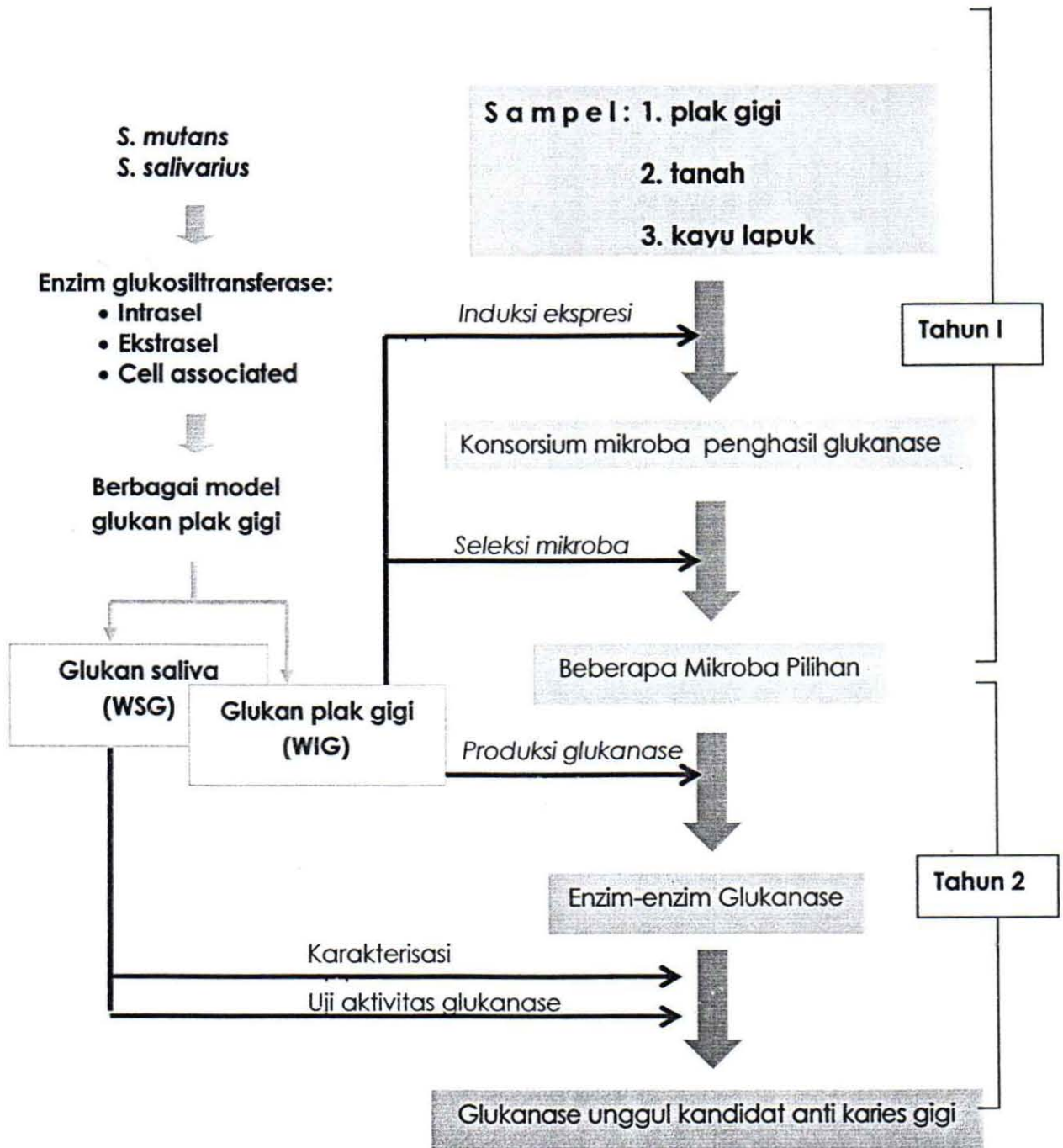
1. Identifikasi semua isolat temuan
2. Produksi enzim glukanase dari setiap isolat temuan
3. Karakterisasi masing-masing enzim glukanase
4. Uji penghambatan pembentukan plak gigi secara *in vitro*

3. METODE PENELITIAN

Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah beberapa jenis enzim glukanase yang diperoleh dari isolat bakteri maupun jamur, yang meliputi *Citrobacter amalonaticus*, *Candida magnolia*, *Codamaea ohmeri*, *Leuconostoc mesenteroides ssp dextranicum*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Sphingobacterium multivorum*, dan *Ochrobactrum anthropi*. Semua isolat tersebut merupakan koleksi Laboratorium biokimia Universitas Airlangga, yang berasal dari hasil percobaan penapisan pada tahun sebelumnya.

Diagram Alir Penelitian



Gambar 1. Diagram alir penelitian

Rincian kegiatan tahun II (terakhir)

1. Identifikasi semua isolat dengan aktivitas enzim glukukanase ganda
2. Kultivasi masing-masing isolat temuan
 - a. Penentuan kurva pertumbuhan
 - b. Pembuatan inokulum
 - c. Penentuan profil produksi enzim glukukanase
 - d. Produksi enzim glukukanase
3. Purifikasi parsial ekstrak enzim glukukanase melalui fraksinasi amonium sulfat.
4. Karakterisasi setiap enzim glukukanase.

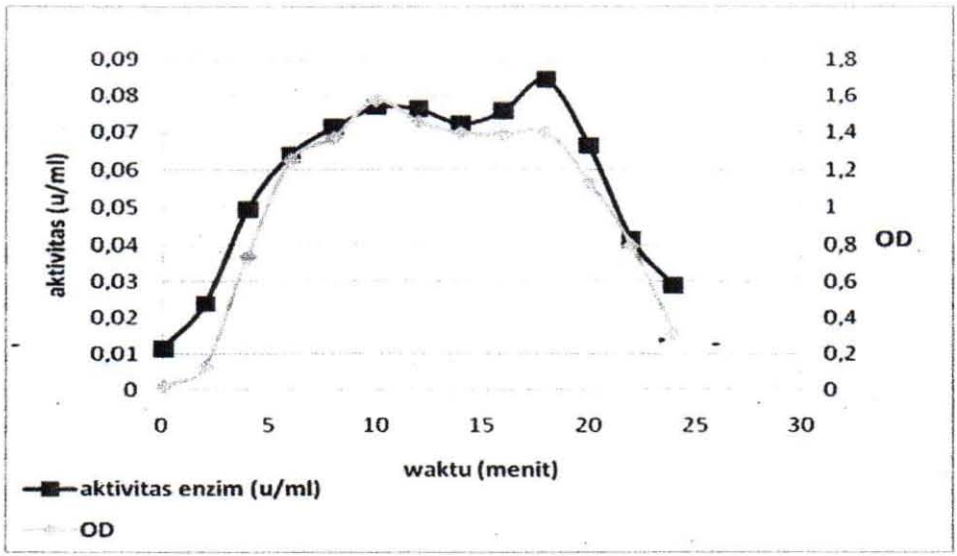
Uji aktivitas α -1,3 dan α -1,6 dilakukan secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri.
5. Uji kekuatan inhibisi pembentukan plak gigi secara in vitro

4. LAPORAN KEMAJUAN.

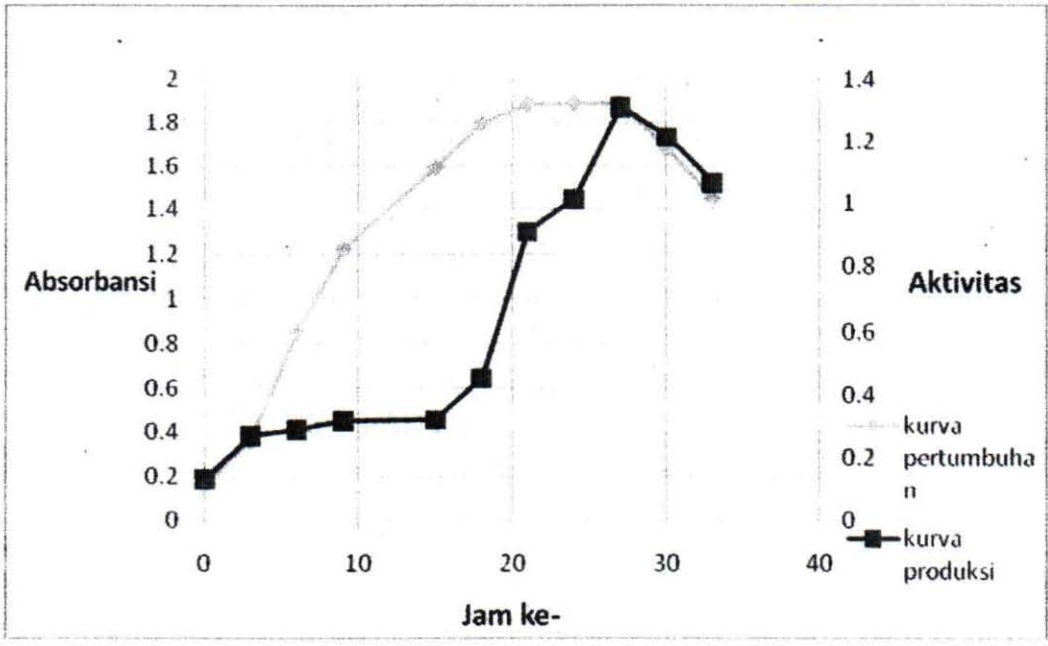
4.1. Produksi enzim glukukanase

Produksi enzim glukukanase skala laboratorium dilakukan dari beberapa isolat temuan terbaik, hasil penelitian tahun pertama. yaitu *Citrobacter amalonaticus*, *Candida magnolia*, *Codamaea ohmeri*, *Leuconostoc mesenteroides ssp dextranicum* dan *Staphylococcus lugdunensis*, *Sphingobacterium multivorum*, *Ochrobactrum anthropi*. Profil pertumbuhan dan produksi enzim glukukanase yang didapat dijadikan acuan untuk menentukan waktu panen sel dalam pembuatan inokulum maupun waktu panen enzim dalam produksi enzim. Sesuai profil masing-masing, panen enzim glukukanase dari *Citrobacter amalonaticus*, *Candida magnolia*, *Codamaea ohmeri*, *Sphingobacterium multivorum*, *Ochrobactrum anthropi* dilakukan pada waktu berturut-turut 16, 26, 24, 14, 10, 11 dan 11 jam proses fermentasi.

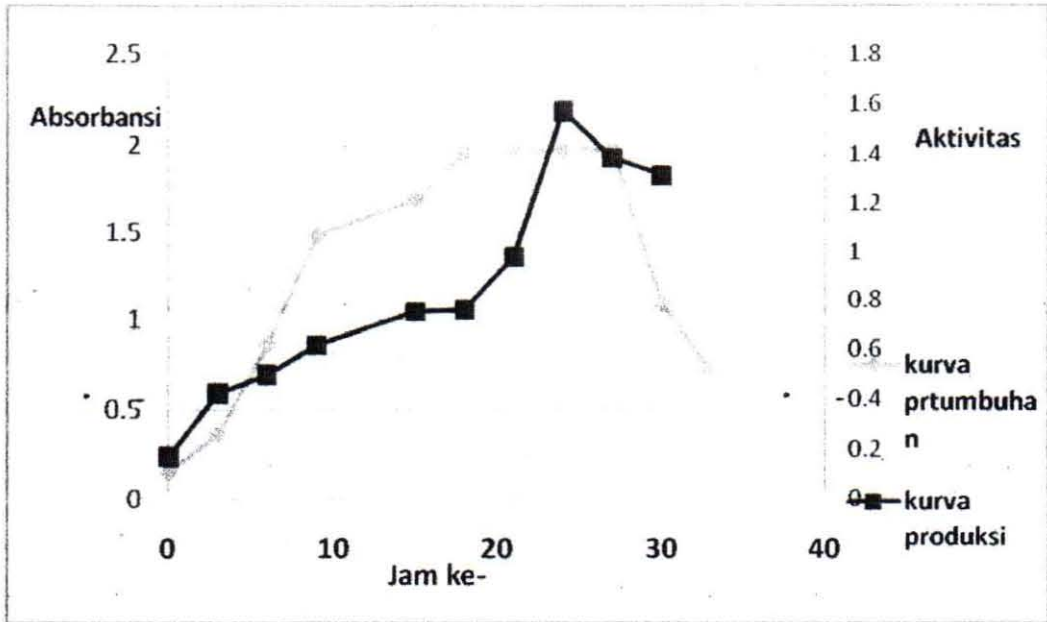
Berdasarkan profil pertumbuhan dan produksi enzim glukukanase masing-masing isolat (Gambar 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8), dilakukan produksi enzim glukukanase. Hasil produksi tersebut berupa beberapa jenis ekstrak kasar enzim glukukanase dengan aktivitas terdapat di Tabel 1.



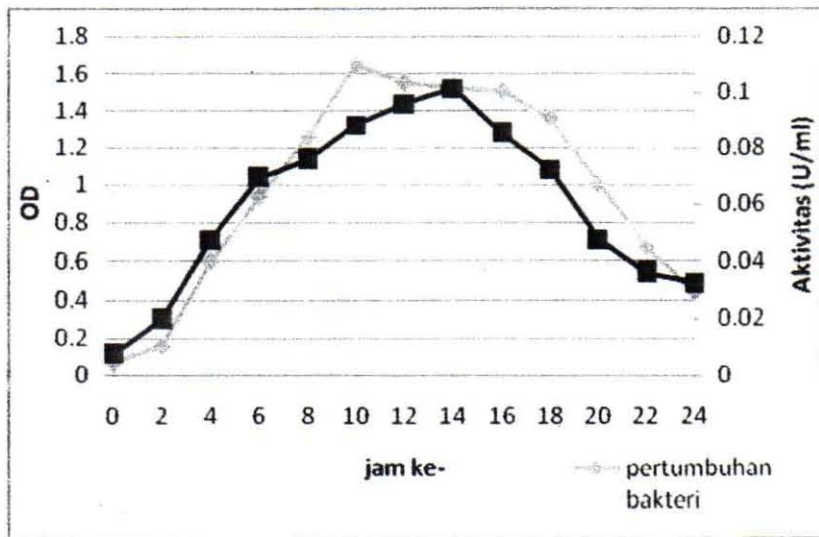
Gambar 2. Kurva pertumbuhan isolat B9 dan profil produksi enzim glukonase



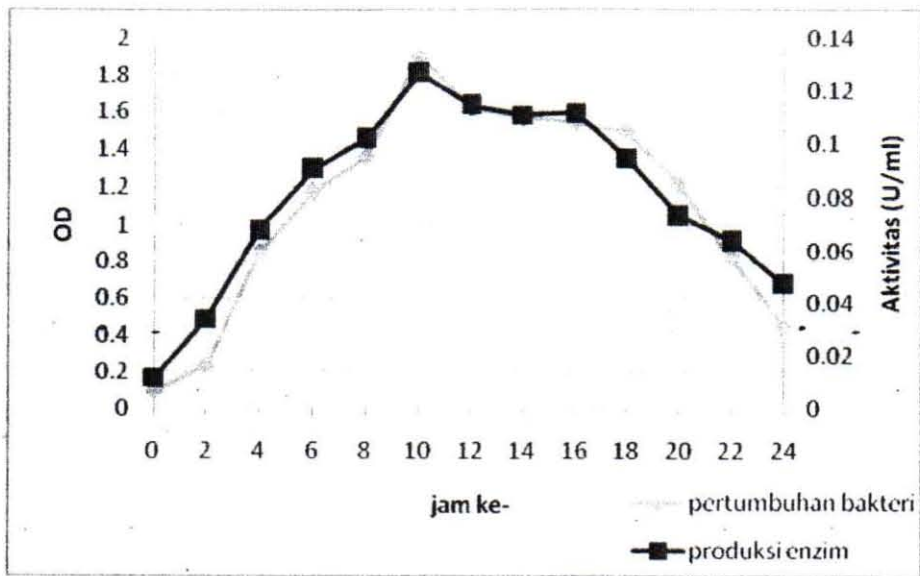
Gambar 3. Kurva pertumbuhan isolat JB3 dan profil produksi enzim glukonase



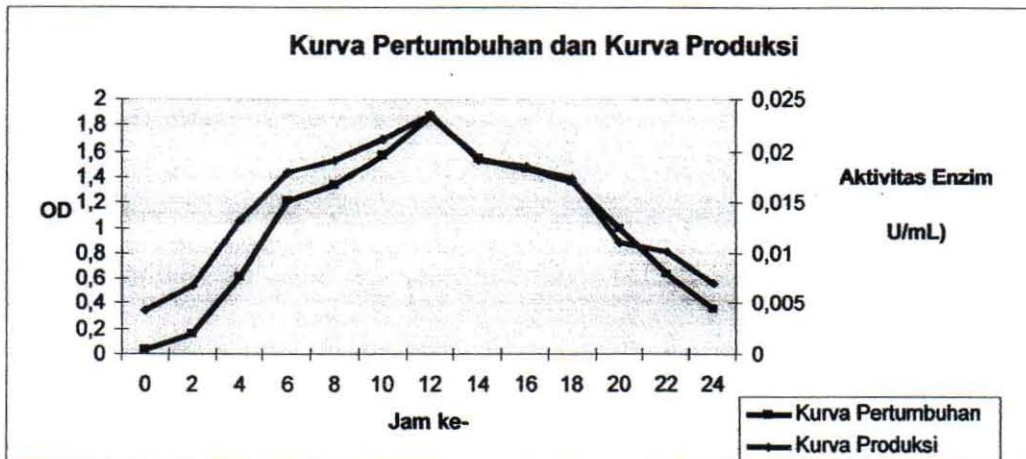
Gambar 4. Kurva pertumbuhan isolat JC3 dan profil produksi enzim glukonase



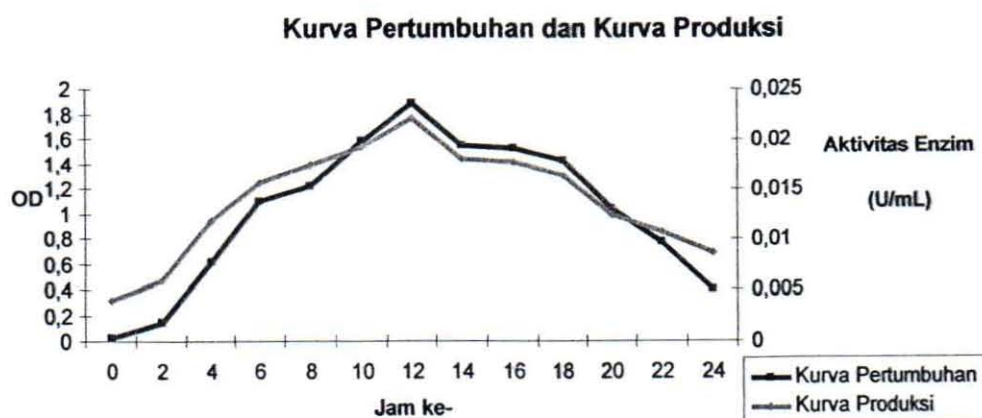
Gambar 5. Kurva pertumbuhan dan pola produksi enzim glukonase dari isolat B4.



Gambar 6. Kurva pertumbuhan dan pola produksi glukonase dari isolat B5.



Gambar 7. Kurva pertumbuhan dan kurva produksi isolat bakteri B7



Gambar8. Kurva pertumbuhan dan kurva produksi bakteri isolat B8

Tabel 1. Data aktifitas dan sumber ekstrak kasar enzim glukanasase

KODE	Asal	Nama Isolat	Aktifitas ekstrak kasar enzim glukanasase / U ^{*)}
B2	Tanah	<i>(Chryseobacterium indologenes)</i>	0,0737
B4	Lumpur	<i>(Leuconostoc mesenteroides)</i>	0,1012
B5	Lumpur	<i>(Staphylococcus ingdunensis)</i>	0,1264
B7	Kayu lapuk	<i>(Sphingobacterium multivorum)</i>	0,1179
B8	Kayu lapuk	<i>(Ochrobactrum anthropi)</i>	0,1116
B9	Tanah	<i>(Citrobacter amalonaticus)</i>	0,0844

Keterangan:

*) Satu unit aktivitas adalah jumlah enzim yang menghidrolisis polimer glukana menghasilkan glukosa 1 μmol per mL per menit yang dihitung sebagai gula pereduksi dalam kondisi percobaan.

4.2. Pemurnian parsial ekstrak kasar enzim glukonase

4.2.1. Pemurnian ekstrak kasar enzim glukonase dari isolat B9

Pemurnian ekstrak kasar enzim glukonase dari isolat B9 dilakukan dengan cara fraksinasi menggunakan garam ammonium sulfat. Percobaan fraksinasi pertama dan kedua berturut-turut terdapat di Tabel 2 dan 3. Percobaan fraksinasi kedua (Tabel 3) menunjukkan hasil yang lebih baik, yaitu terjadi peningkatan kemurnian 3,216 kali yang diketahui dari aktivitas spesifik pada fraksi AS 20-70% jenuh. Peningkatan kemurnian fraksi ini juga tampak pada data hasil analisis SDS-PAGE (Gambar 9), yaitu pita-pita protein yang banyak dan rapat pada sampel ekstrak kasar, setelah difraksinasi menjadi hanya sekitar 3 pita protein.

Tabel 2. Percobaan pertama fraksinasi ekstrak kasar enzim glukonase dengan AS

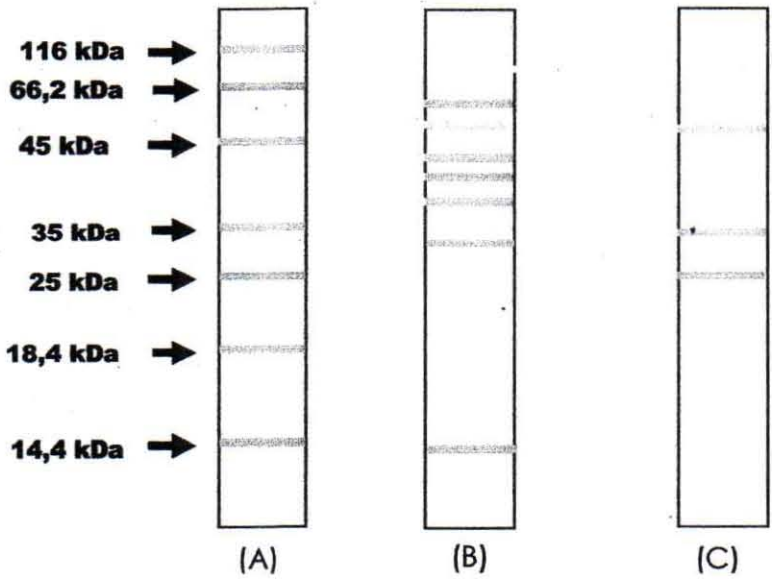
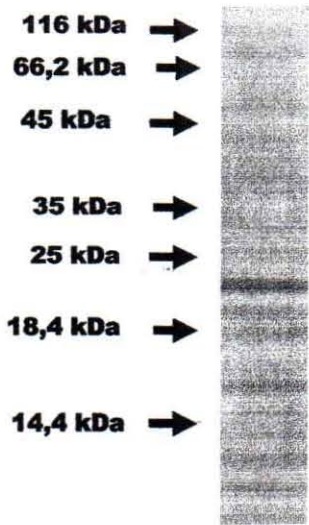
Sampel Enzim Glukanase	Volume (mL)	Aktivitas Total (Unit)	Protein Total (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Peningkatan aktivitas spesifik
Ekstrak Kasar	25	2,31	18,475	0,125	1
Fraksi AS 0-40%	10	0,335	3,2	0,104	
Fraksi AS 40-60%	10	0,549	2,10	0,261	2,088
Fraksi AS 60-80%	10	0,389	2,06	0,188	
Supernatan	25	0,223	5,875	0,038	

Keterangan: AS = ammonium sulfat

Tabel 3. Percobaan kedua fraksinasi ekstrak kasar enzim glukonase dengan AS

Sampel Enzim Glukanase	Volume (mL)	Aktivitas Total (Unit)	Protein Total (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Peningkatan aktivitas spesifik
Ekstrak Kasar	25	2,31	18,475	0,125	1
Fraksi AS 0-20%	8	0,089	1,088	0,0826	
Fraksi AS 20-70%	7	0,4393	1,092	0,402	3,216
Fraksi AS 70-80%	7	0,2317	1,386	0,1671	
Supernatan	25	0,2275	4,05	0,0561	

Keterangan: AS = ammonium sulfat



Gambar 9. Pita protein hasil analisis SDS-PAGE ekstrak kasar enzim glukonase dan fraksi 20-70 (A) Penanda standart protein, (B) ekstrak kasar enzim glukonase, (C) hasil pengendapan amonium sulfat

4.2.2. Pemurnian ekstrak kasar enzim glukonase dari isolate JB3 dan JC3

Hasil fraksinasi enzim glukonase dari isolate JB3 (Tabel 4) menunjukkan penyebaran aktivitas enzim glukonase pada semua fraksi, walaupun aktivitas tertinggi terdapat pada fraksi 40-60. Karena aktivitas glukonase menyebar maka cara purifikasi ini tidak dapat dipilih, sebagai penggantinya ekstrak glukonase dapat dipresipitasi dengan ammonium sulfat 80%.

Tabel 4. Hasil fraksinasi ekstrak kasar enzim glukonase dari isolat JB3

Enzim Glukanase	Volume (ml)	Aktivitas (U/ml)	Kadar protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Yield (%)	Tingkat kemurnian
Ekstrak kasar JB3	100	0.19528	0.57100	0.34199	100	1
Fraksi AS 0-40 % jenuh	10	0.30738	0.07046	4.36247	15.74	12.756
Fraksi AS 40-60% jenuh	10	0.11543	0.01715	6.73061	5.91	19.681
Fraksi AS 60-80% jenuh	10	0.10060	0.10523	0.95600	5.15	2.795
Supernatan	100	Tidak ada data	Tidak ada data	Tidak ada data	Tidak ada data	Tidak ada data

Hasil fraksinasi ekstrak kasar enzim glukonase dari isolat JC3 pada percobaan pertama kurang baik (Tabel 5), kemudian diulang dengan menggeser kadar amonium sulfat, dan didapat data pada Tabel 6. Sesuai data di Tabel 6, aktivitas glukonase mengumpul di fraksi 20-70, dengan aktivitas spesifik sebesar 27.225. metode fraksinasi ini akan digunakan untuk menyiapkan preparat enzim untuk uji *in vivo*.

Tabel 5. Hasil fraksinasi ekstrak kasar enzim glukanas dari isolat JC3 (percobaan pertama)

Tahapan	Volume (ml)	Aktivitas (U/ml)	Kadar protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Yield (%)	Tingkat kemurnian
Ekstrak kasar JC3	100	0.22233	0.73200	0.305729	100	1
Fraksi 0-40 % jenuh	10	0.00182	0.04264	0.04268	0.08	0.141
Fraksi 40-60 % jenuh	10	0.18182	0.03274	5.5545	5.31	18.284
Fraksi 60-80 % jenuh	10	0.14284	0.02723	5.2468	6.42	17.271
Supernatan	100	Tidak ada data	Tidak ada data	Tidak ada data	Tidak ada data	Tidak ada data

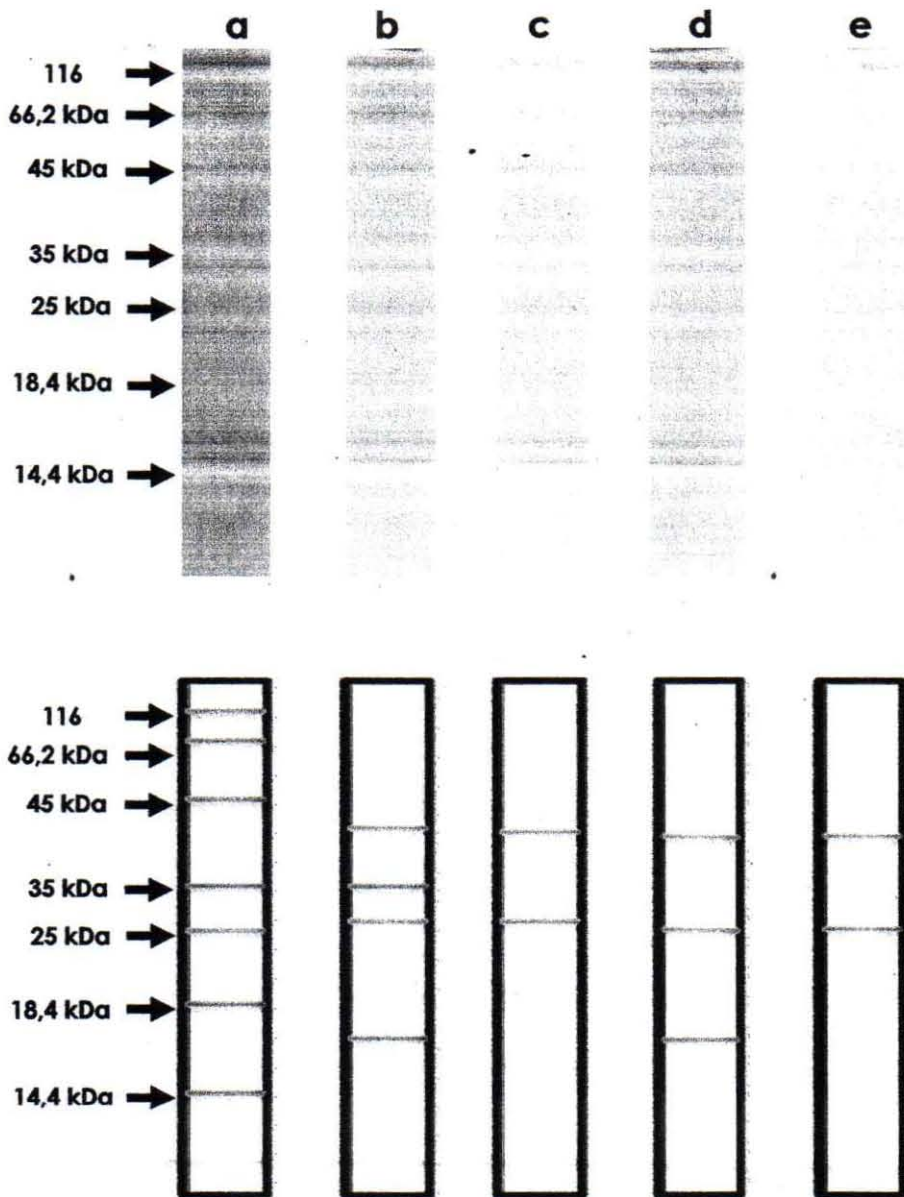
Tabel 6. Fraksinasi ekstrak kasar enzim glukanas dari isolat JC3 (percobaan kedua)

Tahapan	Volume (ml)	Aktivitas (U/ml)	Kadar protein (mg/ml)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Yield (%)	Tingkat kemurnian
Ekstrak kasar JC3	100	0.22233	0.73200	0.305729	100	1
Fraksi 0-40 % jenuh	10	0.00182	0.04264	0.04268	0.08	0.141
Fraksi 40-70 % jenuh	10	0.43379	0.05246	8.26897	19.51	27.225
Supernatan	100	0	Tidak ada data	Tidak ada data	Tidak ada data	Tidak ada data

4.2.3. Pemurnian ekstrak kasar enzim glukanas dari isolat B4 dan B5

Purifikasi parsial enzim glukanas dari dilakukan dengan cara pengendapan dengan garam ammonium sulfat pada kadar 80% jenuh. Hasil analisis SDS-PAGE residu 80% terdapat di Gambar 10. Hasil uji aktivitas terhadap hasil presipitasi enzim glukanas memberikan nilai sebesar 0,12069 U/ml untuk isolat B4 dan 0,12833 U/ml untuk B5, terhadap substrat glukans.

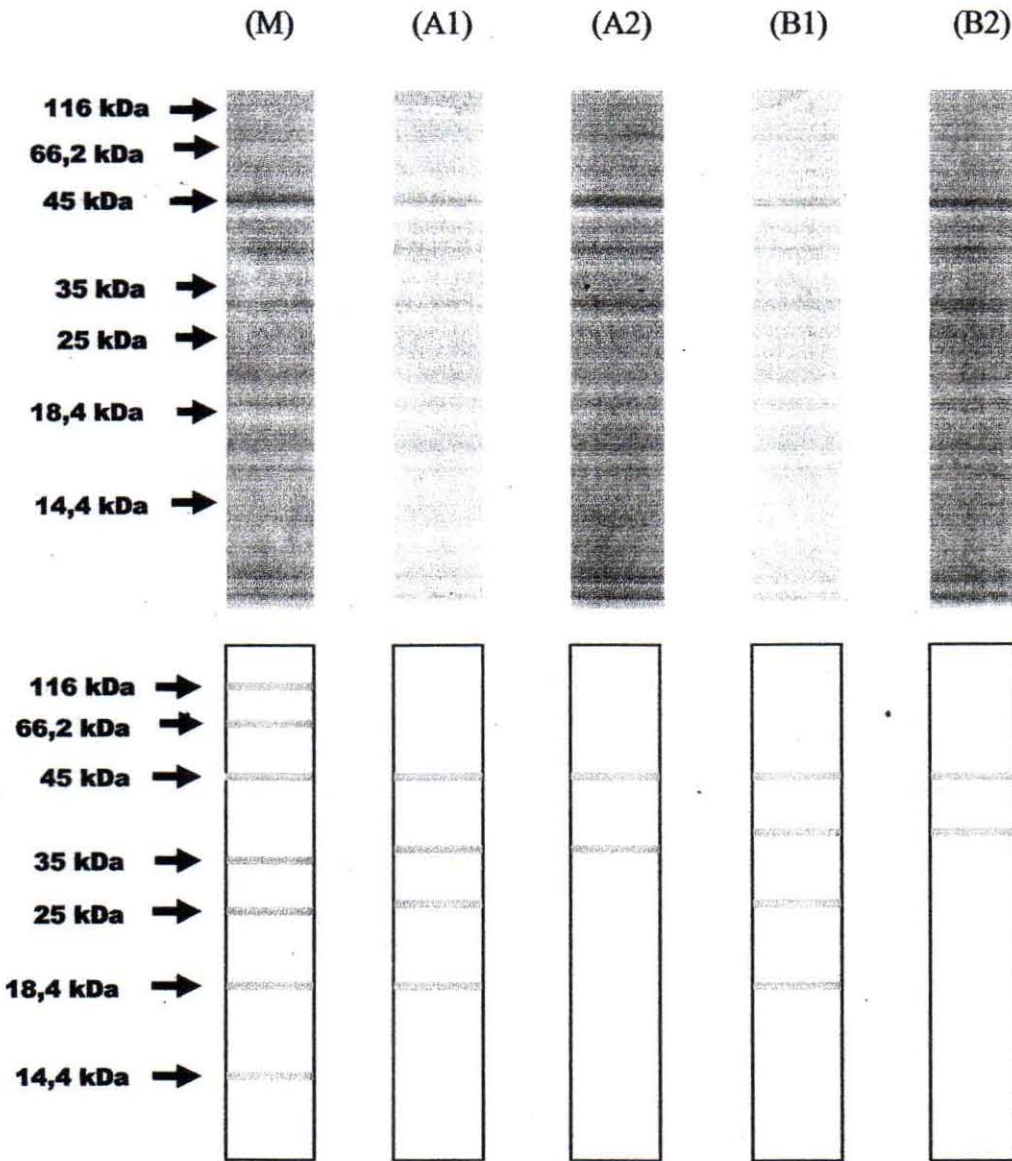
Sedangkan terhadap substrat dekstran adalah 0,39101 U/ml untuk B4 dan 0,425027 U/ml untuk *Staphylococcus lugdunensis*. Baik terhadap media dekstran ataupun glukon, aktivitas setelah presipitasi tidak menunjukkan penurunan nilai.



Gambar 10. Hasil analisis SDS-PAGE enzim glukonase. (a) protein penanda standar; (b) ekstrak kasar enzim glukonase dari isolat B4; (c) ekstrak kasar enzim glukonase dari isolat B5; (d) hasil dialisis enzim glukonase dari isolat B4; (e) hasil dialisis enzim glukonase asal isolat B5.

Data pada Gambar 10 menunjukkan terjadi pengurangan pita protein secara signifikan pada hasil presipitasi. Pita protein dari ekstrak kasar asal isolat B4 memberikan empat pita, dan B5 memberikan lima pita. Setelah presipitasi, masing-masing isolat hanya memberikan dua pita. Dengan demikian ada protein yang hilang setelah melalui proses presipitasi. Jika protein yang hilang adalah enzim glukonase, maka hasil uji aktivitas glukonase terhadap hasil presipitasi akan memberikan penurunan nilai yang signifikan. Sebaliknya jika pita protein yang hilang bukan enzim glukonase maka nilai aktivitas enzim hasil presipitasi tidak akan berkurang. Oleh karena itu, berdasarkan perbandingan data aktivitas enzim glukonase yang telah disebutkan pada sub bagian 4.3 (dalam hal ini aktivitas enzim hasil presipitasi memberikan nilai yang relatif sama atau sedikit lebih tinggi dari ekstrak kasar, yang berlaku untuk kedua substrat), dapat disimpulkan bahwa protein yang ikut mengendap ketika ditambahkan amonium sulfat adalah enzim glukonase, dan protein yang hilang setelah proses presipitasi tidak mempunyai aktivitas hidrolisis terhadap glukon dan dekstran.

4.2.4. Pemurnian ekstrak kasar enzim glukonase dari isolat B7 dan B8



Gambar 11. Profil SDS-PAGE enzim glukonase

(A) Dari isolat bakteri B7: (1) crude enzim, (2) hasil dialisis

(B) Dari isolat bakteri B8: (1) crude enzim, (2) hasil dialisis

(M) Protein penanda

Profil SDS-PAGE enzim glukonase Gambar 11 menunjukkan perbedaan jumlah pita antara ekstrak kasar enzim glukonase dengan hasil presipitasinya dengan amonium sulfat. Hal ini

menunjukkan bahwa presipitasi dengan amonium sulfat mampu meningkatkan kemurnian enzim glukonase. Selain itu, setelah presipitasi dengan amonium sulfat terjadinya peningkatan aktivitas enzim glukonase terhadap substrat dekstran dan glukon.

Baik ekstrak kasar enzim glukonase maupun hasil presipitasinya dengan amonium sulfat selanjutnya diuji aktivitasnya terhadap substrat dekstran dan glukon. Diperoleh aktivitas tertinggi ekstrak kasar enzim glukonase terlihat pada isolat bakteri B7 dengan substrat dekstran yaitu 0,4261 U/mL. Sedangkan dengan substrat glukon sebesar 0,1179 U/mL. Untuk isolat bakteri B8 memiliki aktivitas dengan substrat dekstran sebesar 0,3396 U/mL dan dengan substrat glukon sebesar 0,1112 U/mL. Hal ini menyatakan bahwa komposisi ikatan glikosida α -1,6 lebih banyak dibandingkan dengan ikatan glikosida α -1,3. Aktivitas enzim glukonase hasil presipitasi dengan amonium sulfat 80% jenuh untuk bakteri B7 terhadap substrat dekstran yaitu 0,4888 U/mL, sedangkan terhadap substrat glukon sebesar 0,1294 U/mL. Untuk bakteri isolat B8 memiliki aktivitas terhadap substrat dekstran sebesar 0,3965 U/mL dan terhadap substrat glukon sebesar 0,1243 U/mL.

4.3. Karakterisasi ekstrak enzim glukonase dari beberapa isolat temuan

Hasil karakterisasi enzim glukonase yang meliputi suhu dan pH optimum serta aktivitas terhadap substrat dekstran (aktivitas glukonase α -1,6) dan substrat glukon plak (aktivitas glukonase α -1,3) terdapat di Tabel 7.

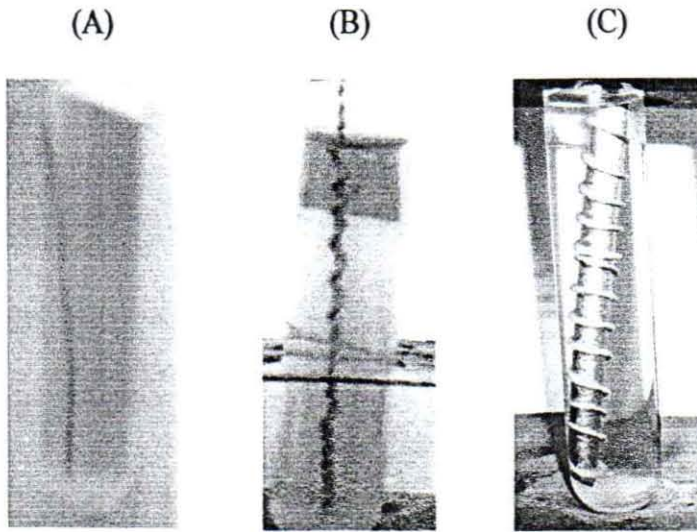
Tabel 7. Hasil karakterisasi ekstrak enzim glukonase dari isolat hasil penapisan

Kode isolat	Nama isolat	pH optimum kisaran/puncak	Suhu optimum [°C]	Aktivitas glukonase terhadap substrat dekstran [glukonase α -1,6]	Aktivitas glukonase terhadap substrat glukon plak [glukonase α -1,3]
JC3	<i>Codamaea ohmeri</i>	4-6 / 6	35	0,2194 U/ml	Tidak ada data
JB3	<i>Candida magnolia</i>	6-6 / 6	35	0,2309 U/mL	Tidak ada data
B9	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	6-8 / 7	37	0,0855 U/ml	Tidak ada data
B4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6-8 / 7	37	0,3910 U/ml	0,1207 U/ml
B5	<i>Staphylococcus ingdunensis</i>	6-8 / 8	37	0,4251 U/mL	0,1286 U/mL
B8	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	6-8 / 8	37	0,3965 U/mL	0,1243 U/mL
B7	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	6-8 / 7	37	0,4888 U/mL	0,1294 U/mL

4.4. Uji kekuatan inhibisi pembentukan plak secara *in vitro*

Model uji *in vitro* dimaksudkan untuk mengetahui dan membandingkan kemampuan enzim glukonase dari beberapa isolat temuan dalam menghambat pembentukan plak gigi buatan yang menempel pada kawat Ni-Cr. Hasil uji menunjukkan bahwa semua enzim glukonase memiliki kemampuan menghambat pembentukan plak pada kawat Ni-Cr. Sebagaimana tampak pada semua gambar hasil percobaan (Gambar 14 sampai dengan 18), bahwa kolonisasi mikroorganisme pada kawat Ni-Cr atau pembentukan plak menurun seiring dengan peningkatan unit enzim glukonase. Adapun pertumbuhan sel tetap terjadi dalam model *in vitro* ini karena suplai nutrisi dilakukan secara periodik. Enzim glukonase yang ditambahkan dalam model *in vitro* ini menghambat penempelan sel pada kawat Ni-Cr namun tidak mematikannya sehingga sel

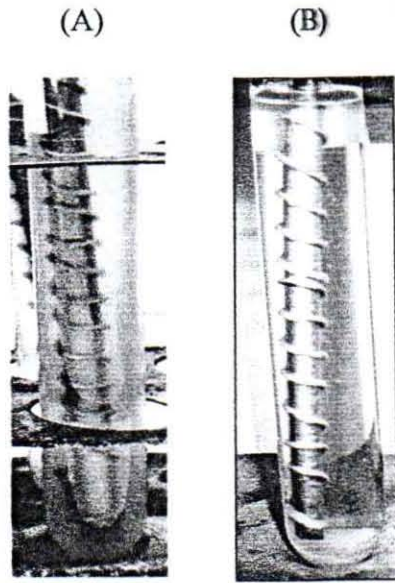
berada di dasar tabung. Pada semua tabung percobaan tampak kolonisasi sel pada dasar tabung, dengan demikian diharapkan pemakaian enzim glukonase tidak mempengaruhi flora normal yang secara alami terdapat di rongga mulut. Jadi keuntungan penggunaan enzim glukonase 1) lunak, 2) mempunyai kerja yang spesifik, 3) tidak mematikan mikroorganisme alami mulut.



Gambar 12. Hasil optimasi desain kawat sebagai media penempelan plak in vitro

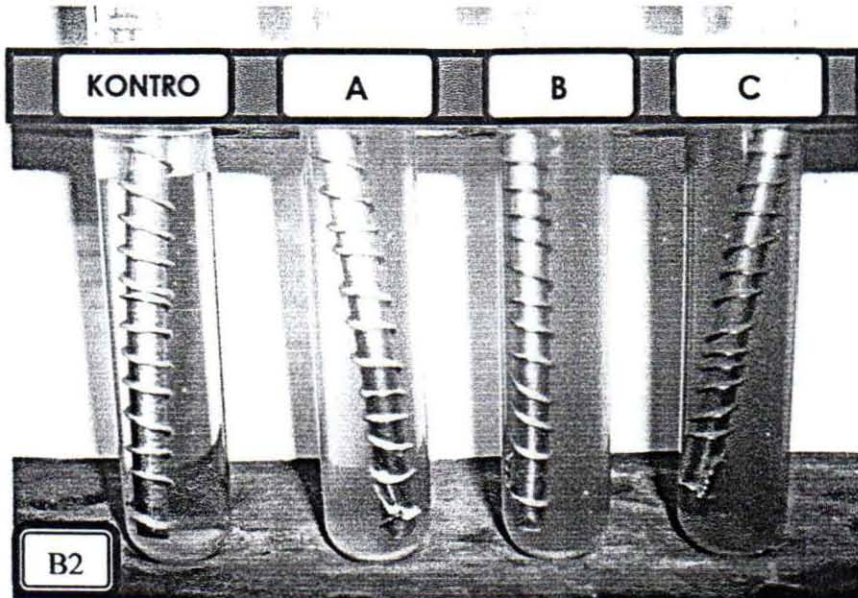
Berdasarkan pengamatan hasil optimasi desain kawat pada Gambar 12, tampak bahwa pembentukan plak paling efektif adalah desain batang kawat pada Gambar 12C.

Dilakukan pula optimasi jenis mikroba pada percobaan pembentukan plak secara *in vitro*, yaitu percobaan A) *S. mutans* saja dan percobaan B) asosiasi *S. mutans* + *C. albicans*. Hasil penentuan plak yang terbentuk melalui pengamatan langsung (Gambar 13) maupun pengukuran kekeruhan menunjukkan bahwa pemakaian mikroba kombinasi *S. mutans* dan *C. albicans* lebih baik daripada pemakaian mikroba tunggal *S. mutans*. Menurut Aizen, et al. (2004). Jamur *C. albicans* merupakan mikroba yang dapat berkolonisasi pada mulut melalui asosiasi dengan *S. mutans* dengan sarana glukon plak.

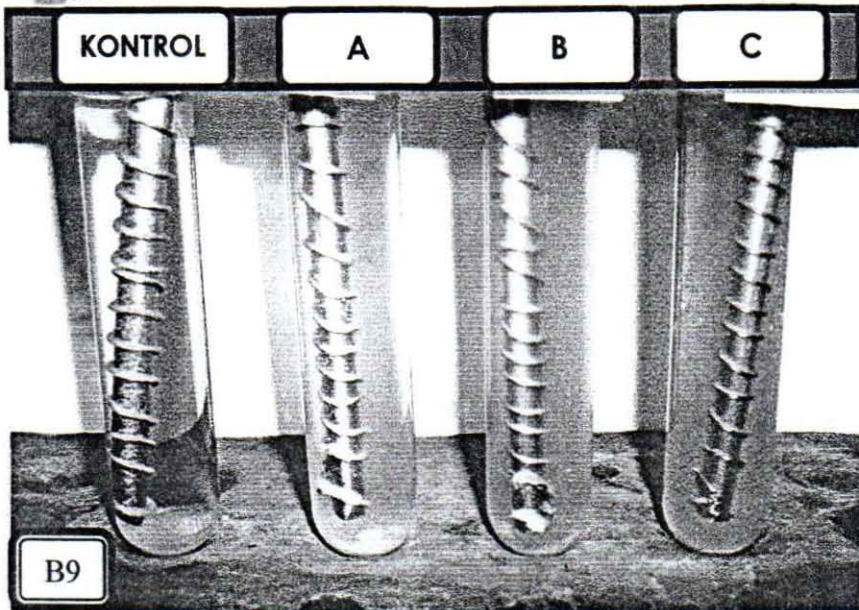


Gambar 13. Pembentukan plak *in vitro* dengan *S. mutans* (A) dan *S. mutans*+*C. albicans* (B)

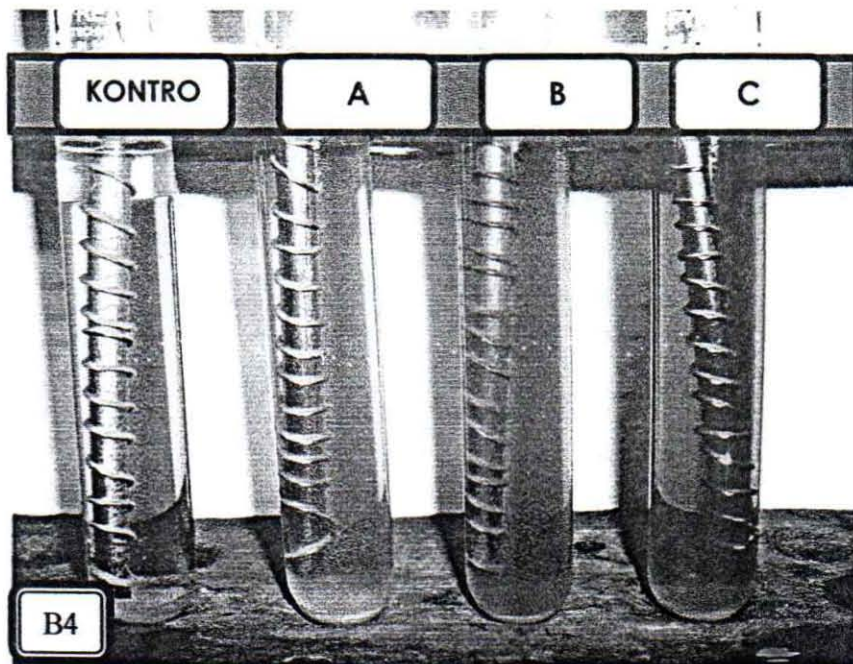
Adapun hasil dari penelitian ini diperoleh foto (pengamatan langsung) sebagai uji kualitatif (Gambar 14 sampai dengan 19) dan perbandingan kekeruhan sebagai uji kuantitatif (Gambar 20 sampai dengan 23).



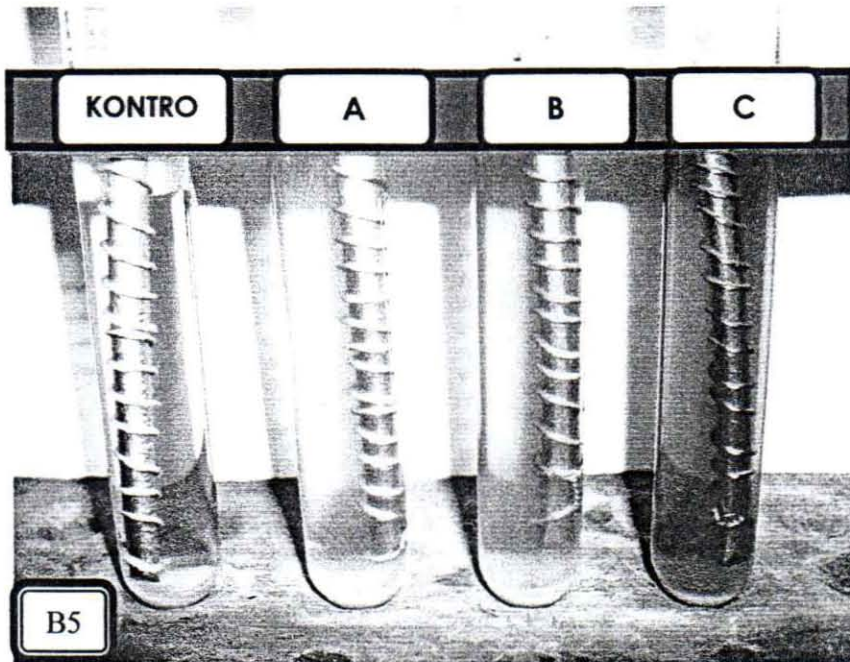
Gambar 14. Hasil uji inhibisi pembentukan plak *in vitro* oleh enzim glukonase dari isolat B2 A, B, dan C berturut turut adalah tabung dengan penambahan enzim glukonase 2.5, 5, 7.5 mL



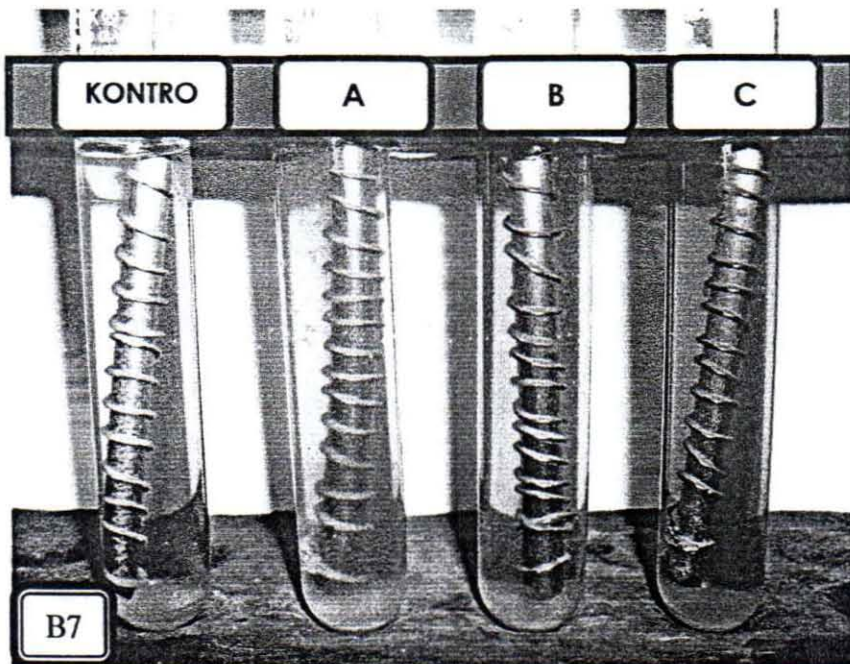
Gambar 15. Hasil uji inhibisi pembentukan plak *in vitro* oleh enzim glukonase dari isolat B9 A, B, dan C berturut turut adalah tabung dengan penambahan enzim glukonase 2.5, 5, 7.5 mL



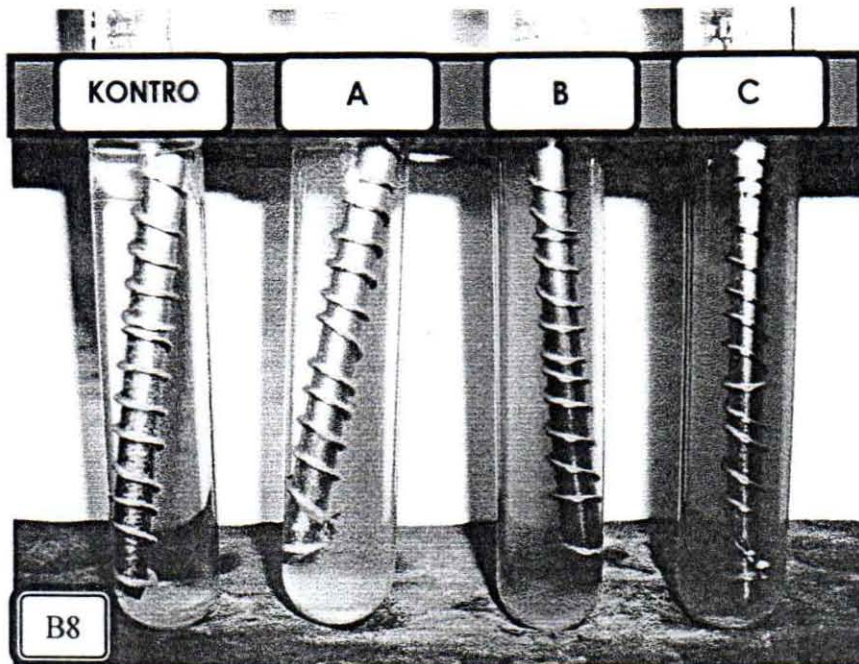
Gambar 16. Hasil uji inhibisi pembentukan plak *in vitro* oleh enzim glukonase dari isolat B4 A, B, dan C berturut turut adalah tabung dengan penambahan enzim glukonase 2.5, 5, 7.5 mL



Gambar 17. Hasil uji inhibisi pembentukan plak *in vitro* oleh enzim glukonase dari isolat B5 A, B, dan C berturut turut adalah tabung dengan penambahan enzim glukonase 2.5, 5, 7.5 mL

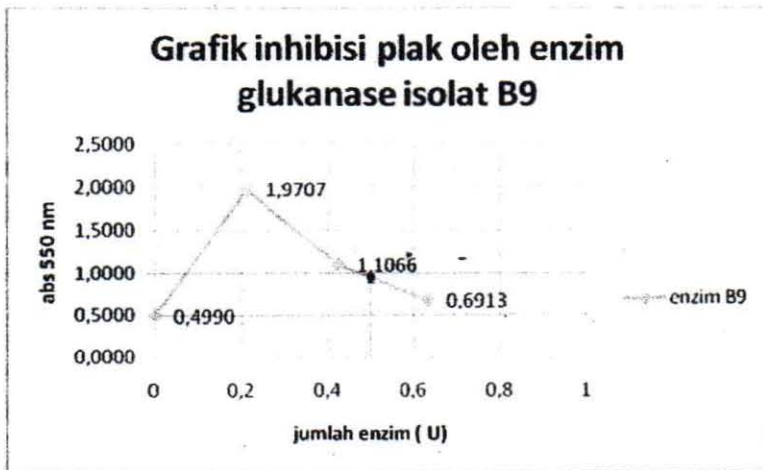


Gambar 18. Hasil uji inhibisi pembentukan plak *in vitro* oleh enzim glukonase dari isolat B7 A, B, dan C berturut turut adalah tabung dengan penambahan enzim glukonase 2.5, 5, 7.5 mL

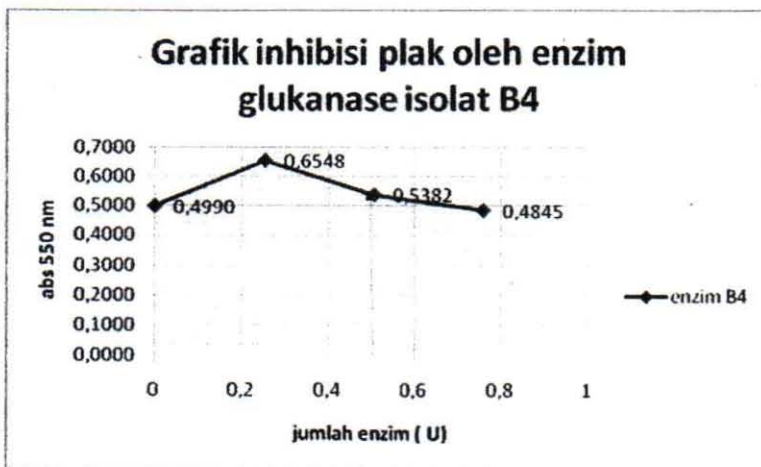


Gambar 19. Hasil uji inhibisi pembentukan plak *in vitro* oleh enzim glukonase dari isolat B8 A, B, dan C berturut turut adalah tabung dengan penambahan enzim glukonase 2.5, 5, 7.5 mL

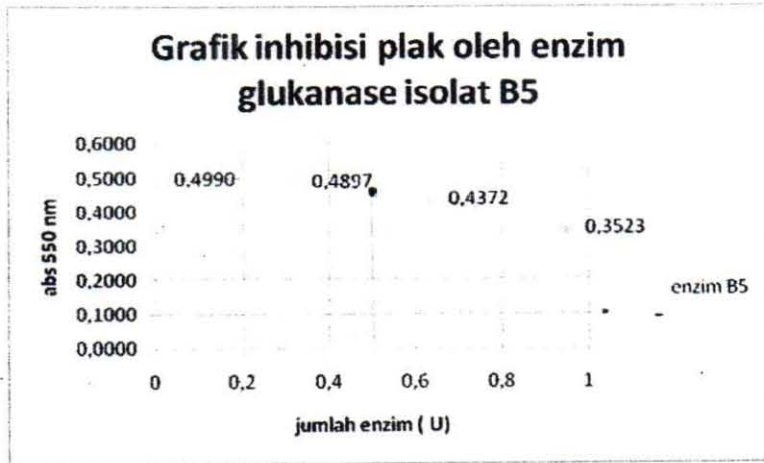
Di samping pengamatan kualitatif secara visual, juga dilakukan pengamatan dengan mengukur kekeruhan suspensi plak yang melekat pada batang kawat. Pengukuran ini dilakukan dengan metode turbidimetri menggunakan Spektrofotometer UV/VIS pada λ yang tidak menyerap (550 nm). Berdasarkan data yang didapat dari pengukuran tersebut (Gambar 20 sampai dengan 23), dapat ditentukan urutan kekuatan enzim-enzim glukonase temuan dalam menghambat pembentukan plak secara *in vitro* (Tabel 8).



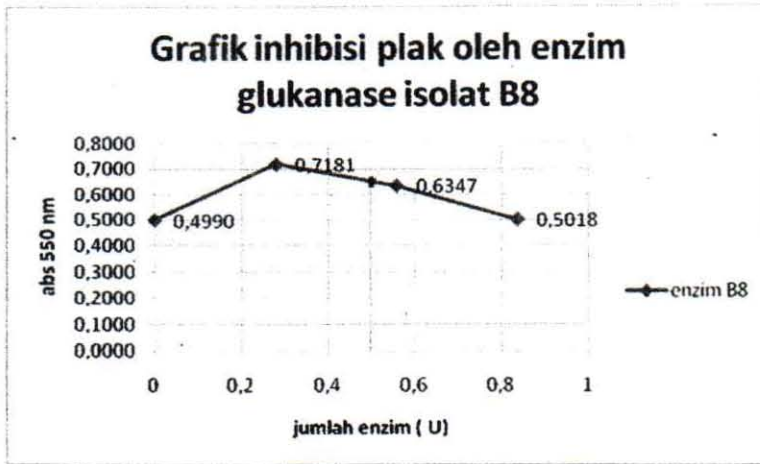
Gambar 20. Grafik pembentukan plak dengan peningkatan unit enzim glukonase isolat B9



Gambar 21. Grafik pembentukan plak dengan peningkatan unit enzim glukonase isolat B4



Gambar 22. Grafik pembentukan plak dengan peningkatan unit enzim glukunase isolat B5



Gambar 23. Grafik pembentukan plak dengan peningkatan unit enzim glukunase isolat B8

Tabel 8. Data penentuan urutan kekuatan enzim glukonase

Isolat Bakteri	Jumlah Unit yang digunakan	Nilai Absorbansi
B2	0.500 U	0.8100
B9	0.500 U	0.9500
B4	0.500 U	0.5300
B5	0.500 U	0.4600
B7	0.500 U	0.4300
B8	0.500 U	0.6500

Secara berturut-turut enzim yang memiliki daya hambat dari yang tertinggi hingga terkecil adalah enzim yang dihasilkan oleh isolat B7, B5, B4, B8, B2 dan B9, seperti tampak di Tabel 8.

LAPORAN HASIL PENELITIAN dan PENGEMBANGAN, KEKAYAAN INTELEKTUAL,
dan HASIL PENGELOLAANNYA

Identitas Perguruan Tinggi / Lembaga Penelitian dan Pengembangan

Nama Perguruan Tinggi / Lembaga Penelitian dan Pengembangan	Lembaga Penelitian dan Pengembangan Universitas Airlangga
Pimpinan	Prof. Dr. Bambang Sektiari L, DEA, drh.
Alamat Perguruan Tinggi / lembaga Litbang	Jalan Mulyorejo, Surabaya

Identitas Kegiatan

Judul Kegiatan Litbang yang Dilakukan	Redisain eksplorasi mikroba penghasil glukonase baru penghidrolisis plak gigi sebagai pencegah karies gigi dan periodontitis
Abstraksi Latar belakang	<p>Prevalensi karies gigi terus meningkat seiring dengan populernya makanan mengandung sukrosa, terutama di negara-negara berkembang seperti Zambia, Indonesia, Sudan, Nigeria, dan Thailand (Lehner, 1995 dan Balakrishnan <i>et al.</i>, 2000). Hasil survei kesehatan rumah tangga (SKRT) tahun 2004 yang dilakukan oleh Departemen Kesehatan menunjukkan bahwa prevalensi karies gigi di Indonesia sangat tinggi, yaitu 90,05% (www.depkes.go.id).</p> <p>Pembentukan karies gigi diinduksi oleh deposit polisakarida ekstrasel yang dihasilkan oleh spesies mikroorganisme dalam rongga mulut yang dikelompokkan dalam mutan <i>Streptococcus</i> (MS). <i>Streptococcus mutans</i> merupakan salah satu anggota MS yang ditemukan dalam jumlah tinggi dalam plak gigi (Roeslan, 1996). Bakteri ini menghasilkan enzim glikosiltransferase yang dapat mengubah sukrosa saliva menjadi polisakarida ekstraseluler yang dinamakan glukon. Senyawa polisakarida ini membentuk struktur matriks penyusun plak, berperan sebagai perekat antar bakteri (Dirks, 1993). Tanzer <i>et al.</i> (1974) melaporkan bahwa mutan <i>Streptococcus mutans</i> yang tidak dapat mensintesis glukon menunjukkan penurunan virulensi. Dengan demikian plak merupakan penyebab utama terbentuknya penyakit gigi dan mulut, terutama karies gigi.</p>

<p>Masalah yang ditangani</p> <p>Tahapan kegiatan dan metodologi</p> <p>Hasil pokok</p>	<p>Jenis glukon yang dibentuk oleh dan berkaitan dengan virulensi <i>S. mutans</i> adalah glukon tak larut air (<i>water insoluble glucan</i>). Glukon tersebut merupakan polisakarida dengan struktur yang kompleks, yaitu berupa polimer glukosa dengan ikatan glikosida α-1,6 dan pada percabangan terdapat ikatan glikosida α-1,3 (Ebisu <i>et al</i>, 1974).</p> <p>Pengembangan metode baru (redesain) penapisan mikroorganisme penghasil enzim yang dapat menghidrolisis glukon plak gigi dari beberapa jenis sampel potensial. Produksi, purifikasi parsial dan karakterisasi enzim glukonase. Uji daya hambat enzim glukonase terhadap pembentukan biofilm/plak secara <i>in vitro</i>.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Identifikasi isolat temuan yang menunjukkan aktivitas glukonase ganda pada uji secara kualitatif 2. Kultivasi masing-masing isolat temuan yang menunjukkan aktivitas glukonase α-1,6 lebih besar daripada aktivitas glukonase α-1,3 <ol style="list-style-type: none"> a. Penentuan kurva pertumbuhan b. Pembuatan inokulum c. Penentuan profil produksi enzim glukonase d. Produksi enzim glukonase 3. Purifikasi parsial dan pemekatan ekstrak enzim glukonase melalui fraksinasi amonium sulfat. 4. Karakterisasi setiap enzim glukonase. Uji aktivitas glukonase α-1,3 dan α-1,6 dilakukan secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri. Juga dilakukan penentuan pH dan suhu optimum setiap enzim. 5. Uji kekuatan inhibisi pembentukan plak gigi secara <i>in vitro</i>. Tabung reaksi kontrol berisi media cair BHIB mengandung sukrosa yang dilengkapi kawat NiCr, disemai dengan <i>S mutans</i>. Adapun tabung eksperimen seperti tabung reaksi control, namun dengan penambahan enzim glukonase dengan kadar yang bervariasi. Kekuatan inhibisi dinyatakan atas dasar tingkat kekeruhan, yang ditentukan melalui pengukuran nilai absorbansi pada $\lambda=550$ nm suspensi plak, yang dibuat dengan cara merontokkan seluruh plak yang menempel pada kawat NiCr ke dalam akuades dengan cara sonikasi. Tingkat kekeruhan suspensi plak yang tinggi proporsional dengan pembentukan plak. <p>Telah diidentifikasi 7 koloni bakteri dan 10 koloni kapang dan ragi penghasil enzim glukonase dengan aktivitas ganda (enzim glukonase α,1-3 dan α,1-6), melalui metode baru yang dikembangkan di tahun sebelumnya dalam rangkaian riset ini. Hasil</p>
---	--

identifikasi secara biokimia terhadap spesies bakteri temuan penghasil enzim glukonase menunjukkan *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter frundii*, *Ochrobactrum anthropi*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp *dextranicum*, *Sphingobacterium multivorum*, *Chryseobacterium indologenes*, dan *Staphylococcus lugdunensis*. Sedang hasil identifikasi spesies fungi temuan penghasil enzim glukonase menunjukkan *Candida famata*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis*, *Candida magnoliae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon osahii* dan *Kodamaea ohmeri*. Tiga di antara isolat temuan belum dapat diungkap melalui identifikasi secara biokimia, karena semua uji yang telah dilakukan tidak menunjukkan kesamaan dengan satupun data yang ada. Diperkirakan tiga isolat tersebut merupakan isolat baru sehingga belum tersedia di data base.

Berdasarkan penapisan isolat temuan lebih lanjut terhadap aktivitas enzim glukonase α ,1-3 dan α ,1-6, maka telah dipilih 6 isolat untuk dilakukan produksi enzim, karakterisasi dan uji penghambatan terhadap pembentukan plak secara *in vitro*.

Produksi, karakterisasi serta uji aktivitas glukonase α ,1-3 dan α ,1-6 dari setiap isolat menunjukkan hasil sebagai pada tabel berikut.

Ko-de	Nama isolat	pH optimum	Suhu optimum [°C]	Aktivitas glukonase (U/mL)	
				α -1,6	α -1,3
B2	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	6	37	Tidak ada data	0,07
B4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6-8 / 7	37	0,39	0,12
B5	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	6-8 / 8	37	0,43	0,13
B7	<i>Sphingobacterium multivorum</i>				0,12
B8	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	6-8 / 8	37	0,40	0,13
B9	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	6-8 / 7	37	0,09	Tidak ada data

Urutan kekuatan daya hambat pembentukan plak gigi oleh enzim-enzim temuan secara *in vitro*, berdasarkan hal ini maka urutan kekuatan enzim glukonase temuan adalah enzim glukonase dari isolat B7 (*Sphingobacterium multivorum*), B5 (*Staphylococcus lugdunensis*), B4 (*Leuconostoc mesenteroides*), B8 (*Ochrobactrum anthropi*), B2 (*Chryseobacterium indologenes*), B9 (*Citrobacter amalonaticus*).

Rencana penelitian berikutnya adalah uji *in vivo* pada hewan uji, kemudian uji klinik pada manusia, untuk menentukan kekuatannya dalam menghambat pembentukan plak gigi dan karies gigi.

Tim Peneliti	
1. Nama Koordinator / Peneliti Utama (PU)	<i>Dr. Afaf Baktir, M.S, (bidang keahlian Biokimia)</i>
2. Alamat Koordinator (PU)	<i>Jalan. Sutorejo Tengah V/20, Surabaya</i>
3. Nama Anggota Peneliti	<p>1. <i>Dr. Indah Listiana Kriswandini M.Kes.,.drg. (bidang keahlian Mikrobiologi Oral)</i></p> <p>2. <i>Purkan S.Si, M.Si (bidang keahlian Biokimia)</i></p>
4. Alamat Anggota Peneliti	<p>1. <i>Jl Bratang Gede VI E – 34</i></p> <p>2. <i>Jalan Graha Asri, Sukodono, Sidoarjo</i></p>
Waktu Pelaksanaan Litbang	<i>2 Pebruari 2009 - 31 Oktober 2009</i>
Publikasi	Sedang disiapkan publikasi di jurnal internasional, dengan judul: "The new glucanase enzymes for dental plaque and biofilm inhibition".

Ringkasan Kekayaan Intelektual	
1. Perlindungan Kekayaan Intelektual yang dihasilkan dari litbang dengan dukungan dana Insentif KNRT periode 2009	
a. Paten	Waktu Pendaftaran: -
b. Hak Cipta	Waktu Pendaftaran: -
c. Merek	Waktu Pendaftaran: -
d. Disain Industri	Waktu Pendaftaran: -
e. Disain Tata Letak Sirkuit Terpadu	Waktu Pendaftaran: -
f. Varietas Tanaman	Waktu Pendaftaran: -
2. Nama Penemuan Baru: Enzim Glukanase α , 1-3 dan α , 1-6	
3. Nama Penemuan Baru Non Komersial	

4. Cara Alih Teknologi

- a. Lisensi
- b. Kerjasama ✓
- c. Pelayanan Jasa Iptek
- d. Publikasi ✓

Ringkasan Hasil Penelitian dan Pengembangan

- 1. Hasil Penelitian dan Pengembangan
 - a. Metode baru untuk penapisan mikroba penghasil enzim dengan aktivitas ganda glukonase α , 1-3 dan α , 1-6 untuk menghidrolisis glukon plak gigi.
 - b. Enzim dengan aktivitas ganda glukonase α , 1-3 dan α , 1-6.
- 2. Produk, Spesifikasi dan Pemanfaatannya
Pemanfaatan enzim sebagai komponen pasta gigi dan obat kumur untuk mencegah karies gigi dan periodontitis.
- 3. Gambar/photo Produk Hasil Penelitian dan Pengembangan
--

Pengelolaan

1. Sumber Pembiayaan Penelitian dan Mitra Kerja

- a. APBN (insentif KNRT) : Rp –
- b. APBD : Rp –
- c. Mitra Kerja
 - Dalam Negeri : Rp –
Nama Mitra
 - Luar Negeri : Rp –
Nama Mitra

2. Pemanfaatan Sarana dan Prasarana Penelitian

- a. Sarana : Laboratorium Biokimia Fakultas Sains dan Teknologi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
- b. Prasarana:

3. Pendokumentasian : CD

Surabaya, 8 November 2009

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengembangan
Universitas Airlangga,



Prof. Dr. Bambang Sektiari L, DEA, drh.
NIP. 131837004