



LABORAN
HIBAH PENELITIAN PROYEK DUE-Like III
Tahun Anggaran 2006/2007



**INOVASI PRODUK BIOTEKNOLOGI UNGGUL
UNTUK MENGATASI KARIES GIGI MELALUI
EKSPLORASI ENZIM RONGGA MULUT**

Dr. Afaf Baktir, MS.

Drs. Sofijan Hadi, MKes.

Purkan, SSi, MSi.

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
Desember, 2006**

upload

- DENTAL CARIES - PREVENTION

LP 100/07
Bah



LAPORAN
HIBAH PENELITIAN PROYEK DUE-Like III
Tahun Anggaran 2006/2007



**INOVASI PRODUK BIOTEKNOLOGI UNGGUL
UNTUK MENGATASI KARIES GIGI MELALUI
EKSPLOKORASI ENZIM RONGGA MULUT**

Dr. Afaf Baktir, MS.

Drs. Sofijan Hadi, MKes.

Purkan, SSi. MSi.

010007141

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS AIRLANGGA
Desember, 2006**

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

010007141

**LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN KEGIATAN
HIBAH PENELITIAN PROYEK DUE-LIKE BATCH III
PERIODE ANGGARAN 2006/2007**

Judul : INOVASI PRODUK BIOTEKNOLOGI
UNGGUL UNTUK MENGATASI KARIES
GIGI MELALUI EKSPLORASI ENZIM
RONGGA MULUT

Ketua Peneliti:

Nama : Dr. Afaf Baktir, MS..

Pangkat/Golongan : Pembina / IV-a

Bidang Keahlian : Biokimia

Jabatan : Lektor Kepala

Unit Kerja : Jurusan Kimia FMIPA Unair

Alamat Surat Jurusan Kimia : Fakultas MIPA Universitas Airlangga,
Kampus C Unair, Jl Mulyorejo, Surabaya.

Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS AIRLANGGA

Jangka Waktu : 6 (enam) bulan

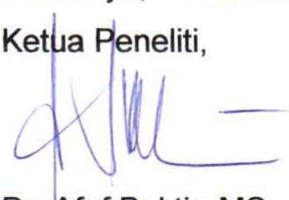
Biaya yang diajukan : Rp 30.000.000,- (tiga puluh juta rupiah)}

Mengetahui Fakultas,
Dekan FMIPA,


Drs. Latief Burhan, MSc
NIP. 131286709

Surabaya, 14 Maret 2006

Ketua Peneliti,


Dr. Afaf Baktir, MS.
NIP. 131286710

Menyetujui,

Direktur Eksekutif LPIU
Universitas Airlangga


Tjitjik Sidi Jahjandarie, Ph.D.
NIP. 131801627

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah *rabbil'alamin*, segala puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan nikmat, taufiq dan hidayah-Nya sehingga penyusun dapat menyelesaikan laporan penelitian berjudul **INOVASI PRODUK BIOTEKNOLOGI UNGGUL UNTUK MENGATASI KARIES GIGI MELALUI EKSPLORASI ENZIM RONGGA MULUT**.

Penelitian ini dimaksudkan untuk melatih mahasiswa bidang minat Biokimia melakukan eksplorasi bahan alam Indonesia melalui pendekatan menyeluruh dan sistematis. Di samping itu hasil dari tahap penelitian awal ini akan diteliti lebih lanjut sampai didapat produk industri yang siap dipasarkan.

Penulis menyampaikan terima kasih pada Ketua Proyek DUE-Like III, Ketua Jurusan Kimia, Kepala Laboratorium Kimia Organik/Biokimia FMIPA Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan.

Terima kasih yang sebesar-besarnya juga disampaikan kepada mahasiswa dan semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

Surabaya, Desember 2006

Penulis

DAFTAR ISI



Judul	Halaman
LEMBAR JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
RINGKASAN	1
ABSTRAK	2
BAB 1. PENDAHULUAN	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	7
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	13
BAB 4. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	17
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
DAFTAR PUSTAKA	35

DAFTAR TABEL

Nomor Tabel	Judul	Halaman
2.1	Komposisi plak gigi	7
4.1	Uji biokimia bakteri <i>S. mutans</i>	18
4.2	Hasil karakterisasi <i>S. Salivarius</i>	20
4.3	Data optimasi kadar sukrosa dan waktu inkubasi pada produksi glukan dari glukosiltransferase E	28
4.4	Data optimasi kadar sukrosa dan waktu inkubasi pada produksi glukan dari glukosiltransferase CA	29
4.5	Hasil uji komponen <i>kinangan</i> sebagai inhibitor enzim glukosiltransferase	33

DAFTAR GAMBAR

Nomor Tabel	Judul	Halaman
2.1	Reaksi-reaksi yang dikatalisis oleh enzim glukosiltransferase	8
2.2	Struktur glukon larut air (WSG)	9
2.3	Struktur glukon tidak larut air (WIG)	10
4.1	Isolat <i>S. mutans</i> pada media padat TYC	18
4.2	Hasil uji biokimia <i>S. mutans</i> dengan menggunakan berbagai jenis substrat	19
4.3	Isolat <i>S. salivarius</i> pada media padat TYC	20
4.4	Hasil uji biokimia <i>S. salivarius</i> terhadap beberapa senyawa Organik	21
4.5	Kurva pertumbuhan <i>S. mutans</i>	22
4.6	Pola pertumbuhan <i>S. salivarius</i> pada $\lambda_{600 \text{ nm}}$	23
4.7	Pola produksi enzim glukosiltransferase oleh <i>S. mutans</i> dalam media produksi BHIB	24
4.8	Hubungan kurva pertumbuhan <i>S. mutans</i> dengan aktivitas enzim glukosiltransferase	25
4.9	Pola produksi enzim glukosiltransferase oleh <i>S. Salivarius</i>	26
4.10	Hubungan Pola pertumbuhan <i>S. salivarius</i> (biru)dengan Pola produksi enzim glukosiltransferase (merah).	27
4.11	Profil KLT supernatan pada uji kelarutan glukon	30
4.12	Uji kualitatif enzim glukonase pada supernatan biakan cair menggunakan agar dekstran biru	31
4.13	Biakan agar hasil penapisan bakteri penghasil enzim glukonase	32

RINGKASAN

Karies gigi merupakan penyakit infeksi yang paling banyak dijumpai, serta penyebab utama hilangnya gigi pada anak-anak dan orang dewasa. Negara berkembang seperti Zambia, Indonesia, Sudan, Nigeria dan Thailand, masih menunjukkan peningkatan prevalensi karies gigi yang tajam. Adapun di negara barat prevalensi karies gigi 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-kasus fluorosis, berupa *mottling (burik)* pada enamel dan efek toksik yang lain.

Penelitian ini bertujuan untuk melatih mahasiswa dalam kelompok melakukan kajian dan penelitian yang sistematis, menyeluruh, dimulai sejak dari hulu, untuk mengeksplorasi bahan-bahan yang dapat mencegah pembentukan karies gigi. Tujuan khusus penelitian ini adalah: mengisolasi mikroba penghasil enzim glukosiltransferase dari saliva dan dari gigi yang berkaries pada rongga mulut manusia; memproduksi enzim glukosiltransferase dari strain mikroba yang diperoleh; memproduksi beberapa jenis glukan menggunakan ekstrak enzim glukosiltransferase dari strain tersebut; menapis isolat-isolat lokal Indonesia penghasil enzim dekstranase dan mutanase yang memiliki peluang sebagai anti karies gigi terbaik; serta menguji beberapa sumber nabati Indonesia yang potensial sebagai inhibitor glukosiltransferase.

Sampel saliva dan hapusan karies gigi yang diambil dari rongga mulut manusia disemaikan dalam medium TYC untuk mengisolasi *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus salivarius*. Kedua isolat ini digunakan sebagai sumber enzim glukosiltransferase. Produksi enzim glukosiltransferase dilakukan dalam medium BHIB secara anaerob menggunakan cangkup lilin. Enzim glukosiltransferase yang didapat merupakan subyek bagi dua buah *start point* penelitian berikut. Pertama, glukosiltransferase sebagai katalis untuk sintesis glukan rongga mulut manusia (WIG dan WSG). Selanjutnya glukan ini digunakan sebagai substrat untuk penapisan mikroba tanah. Kedua, glukosiltransferase yang didapat digunakan untuk penapisan bahan alam yang memiliki aktivitas inhibitor terhadap enzim ini. Identifikasi aktivitas inhibitor glukosiltransferase dilakukan dengan cara pengukuran tingkat penurunan aktivitas glukosiltransferase.

Telah diisolasi *Streptococcus salivarius* dan *Streptococcus mutans* dari rongga mulut manusia, dan telah diproduksi ekstrak enzim glukosiltransferase dari

kedua isolat tersebut, yang memberikan aktivitas berturut-turut 166,29 U/mL dan 96,20 U/mL. Glukan yang diproduksi dari glukosiltransferase *Streptococcus mutans*, menunjukkan karakteristik sebagai WIG (*water erhainsoluble glucan*). Telah didapat koleksi bakteri-bakteri penghasil enzim glukukanase dari tanah, yang memberikan aktivitas glukukanase berupa *halo* di sekitar koloni pada media agar dekstran biru. Komponen *kinangan* (tembakau, jambe dan gambir) memberikan aktivitas inhibitor terhadap enzim glukosiltransferase dari *Streptococcus mutans*.

Disarankan untuk menapis bakteri dari koleksi yang didapat menggunakan substrat glukan yang berasal dari *Streptococcus salivarius* maupun *Streptococcus mutans*, untuk mendapatkan bakteri penghasil enzim yang dapat menghidrolisis berbagai jenis glukan, terutama glukan plak gigi. Disarankan pula untuk menentukan daya inhibisi setiap komponen *kinangan* terhadap semua jenis enzim glukosiltransferase yang terdapat di rongga mulut, guna menentukan efektifitas pemakaian bahan tersebut sebagai anti karies gigi.

ABSTRAK

Karies gigi merupakan penyakit infeksi yang paling banyak dijumpai, serta penyebab utama hilangnya gigi pada anak-anak dan orang dewasa. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi bahan-bahan yang dapat mencegah pembentukan karies gigi. Tujuan khusus penelitian ini adalah: mengisolasi mikroba penghasil enzim glukosiltransferase dari saliva dan dari gigi yang berkaries pada rongga mulut manusia; memproduksi enzim glukosiltransferase dari strain mikroba yang diperoleh; memproduksi beberapa jenis glukukan menggunakan ekstrak enzim glukosiltransferase dari strain tersebut; menapis isolat-isolat lokal Indonesia penghasil enzim dekstranase dan mutanase yang memiliki peluang sebagai anti karies gigi terbaik; serta menguji beberapa sumber nabati Indonesia yang potensial sebagai inhibitor glukosiltransferase.

Sampel saliva dan hapusan karies gigi yang diambil dari rongga mulut manusia disemaikan dalam medium TYC untuk mengisolasi *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus salivarius*. Kedua isolat ini digunakan sebagai sumber enzim glukosiltransferase. Produksi enzim glukosiltransferase dilakukan dalam medium BHIB secara anaerob menggunakan cangkup lilin. Enzim glukosiltransferase yang didapat merupakan subyek bagi dua buah *start point* penelitian berikut. Pertama, glukosiltransferase sebagai katalis untuk sintesis glukukan rongga mulut manusia (WIG dan WSG). Selanjutnya glukukan ini digunakan sebagai substrat untuk penapisan mikroba tanah. Kedua, glukosiltransferase yang didapat digunakan untuk penapisan bahan alam yang memiliki aktivitas inhibitor terhadap enzim ini. Identifikasi aktivitas inhibitor glukosiltransferase dilakukan dengan cara pengukuran tingkat penurunan aktivitas glukosiltransferase.

Telah diisolasi *Streptococcus salivarius* dan *Streptococcus mutans* dari rongga mulut manusia, dan telah diproduksi ekstrak enzim glukosiltransferase dari kedua isolat tersebut, yang memberikan aktivitas berturut-turut 166,29 U/mL dan 96,20 U/mL. Glukukan yang diproduksi dari glukosiltransferase *Streptococcus mutans*, menunjukkan karakteristik sebagai WIG (*water insoluble glucan*). Telah didapat koleksi bakteri-bakteri penghasil enzim glukukanase dari tanah, yang memberikan aktivitas glukukanase berupa *halo* di sekitar koloni pada media agar dekstran biru. Komponen *kinangan* (tembakau, jambe dan gambir) memberikan aktivitas inhibitor terhadap enzim glukosiltransferase dari *Streptococcus mutans*.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Telah dilakukan sejumlah penelitian eksplorasi enzim dekstranase dari mikroba yang diisolasi dari rongga mulut manusia. Enzim-enzim tersebut dilaporkan tidak efisien menghidrolisis plak gigi (Caldwel et al., 1971; Lobene et al., 1971), bahkan disinyalir sebagai biang pembentukan plak dan karies gigi dengan cara sebagai berikut. Enzim dekstranase ini menghidrolisis glukosa secara parsial sehingga WSG yang larut dalam saliva diubah menjadi WIG yang tidak larut. WIG ini akan menempel pada permukaan gigi dan berfungsi sebagai perekat bagi mikroba-mikroba mulut (Balakrishnan et al., 2000). Ada dua penyebab mengapa sejumlah enzim dekstranase yang selama ini dilaporkan belum ada yang mampu menghidrolisis glukosa plak gigi secara sempurna, yaitu yang pertama: Kebanyakan enzim dekstranase yang dilaporkan untuk karies gigi dieksplorasi dari mikroba rongga mulut manusia. Enzim dekstranase dari normal flora rongga mulut kebanyakan memiliki pH optimum yang kisarannya sempit, sehingga dengan fluktuasinya pH di rongga mulut aktivitas enzim menjadi sangat rendah bahkan hilang. Berdasarkan pertimbangan ini maka pada rencana penelitian mikroba penghasil dekstranase tidak diambil dari rongga mulut, akan tetapi diisolasi dari tanah. Kedua: glukosa yang merupakan enzim induktif seharusnya tidak ditapis dari mikroba menggunakan inducer glukosa yang didominasi ikatan glikosida α -1,6 (dekstran), karena dengan inducer ini enzim yang didapat hanyalah enzim yang menghidrolisis sempurna dekstran, namun tidak dapat menghidrolisis sempurna glukosa plak yang didominasi ikatan glikosida α -1,3, sebagaimana yang telah dilaporkan oleh Baktir dan Murdiyatmo (2005) tentang

penemuan enzim dekstranase B7DEX. Enzim ini memiliki aktivitas relatif tinggi terhadap dekstran ($31,88 \pm 1,24$ U/mL) tetapi rendah terhadap glukon plak gigi ($7,38 \pm 0,66$ U/mL). Oleh karena itu pada rencana penelitian ini hendak dicoba penggunaan induser glukon yang berasal dari plak gigi, yaitu glukon yang tidak larut air (WIG), untuk menapis mikroba penghasil enzim penghidrolisis glukon plak. Dengan demikian dapat dipastikan memperoleh mikroba unggulan penghasil enzim yang dapat mengkonsumsi dan menghidrolisis sempurna glukon plak gigi.

1.2. TUJUAN KHUSUS

1. Mengisolasi mikroba penghasil enzim glukosiltransferase dari saliva (*Streptococcus salivarius*)
2. Mengisolasi mikroba penghasil enzim glukosiltransferase dari gigi yang berkaries (*Streptococcus mutans*) pada rongga mulut manusia.
3. Memproduksi enzim glukosiltransferase dari strain *S. salivarius* yang didapat
4. Memproduksi enzim glukosiltransferase dari strain *S. mutans* yang didapat
5. Memproduksi beberapa jenis glukon menggunakan ekstrak enzim glukosiltransferase dari *S. mutans*
6. Menapis isolat-isolat lokal Indonesia penghasil enzim dekstranase yang memiliki peluang sebagai anti karies gigi terbaik
7. Menguji beberapa sumber nabati Indonesia yang potensial sebagai inhibitor glukosiltransferase

1.3. MANFAAT PENELITIAN

Gen glukonase dari mikroba unggulan yang diperoleh pada penelitian berikutnya dapat diklon dan diekspresikan di normal flora (bakteri) rongga mulut

manusia, sehingga dihasilkan mikroba rekombinan yang dapat menghasilkan enzim glukukanase unggulan secara sinambung di lokasi-lokasi tertentu pada gigi yang tidak terjangkau oleh sikat gigi. Hal ini akan menyelesaikan problema karies gigi yang sampai sekarang prevalensinya masih meningkat terus dan belum ditemukan solusi tuntasnya yang aman, baik di negara-negara berkembang maupun maju.

Penelitian yang diusulkan ini merupakan sarana untuk melatih mahasiswa di bidang minat Biokimia. Mahasiswa yang telah mendapatkan berbagai materi pembelajaran Biokimia, berlatih dalam kelompok untuk mencermati dan menganalisis kasus tertentu secara menyeluruh melalui paradigma Biokimia, kemudian melakukan penelitian untuk mencapai tujuan umum yang terkait dengan eksplorasi keanekaragaman hayati Indonesia. Salah satu potensi keanekaragaman hayati adalah bahan alam dan mikroorganisme penghasil enzim-enzim yang dapat mengatasi masalah karies gigi.

Rencana penelitian ini mengusulkan bagian hulu dari sebuah penelitian berkelanjutan untuk menghasilkan produk bioteknologi unggulan, yaitu senyawa alam dan enzim-enzim industri, yang pada tahap penelitian selanjutnya akan dikembangkan menjadi barang komoditi, meliputi:

1. Enzim glukukanase yang dapat berfungsi sebagai anti karies gigi
2. Enzim glukukanase yang dapat digunakan di pabrik gula
3. Senyawa atau bahan alam dengan aktivitas inhibitor glukosiltransferase yang dapat digunakan sebagai anti karies gigi

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Karakteristik Kimia Plak Gigi

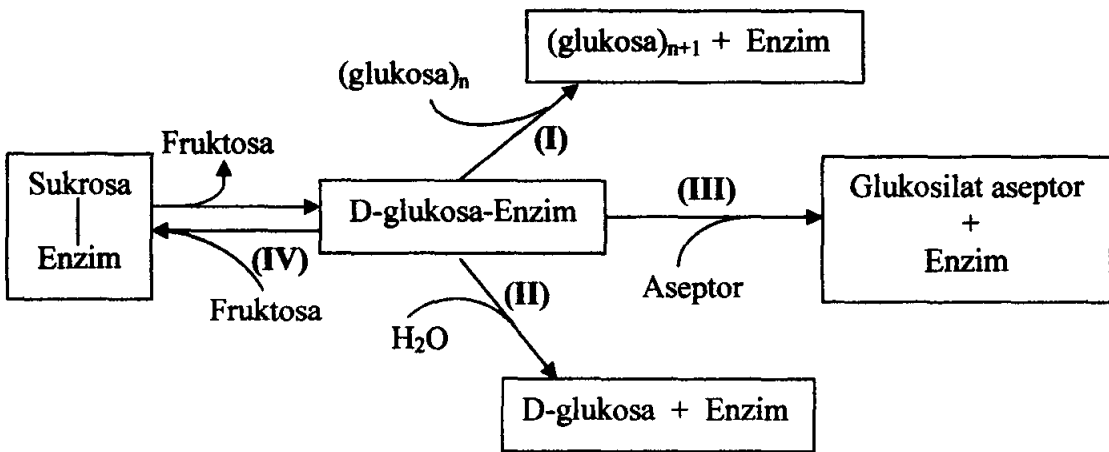
Definisi plak gigi secara umum adalah akumulasi bakteri yang berasosiasi dengan permukaan gigi yang tidak dapat dihilangkan dengan semprotan air. Plak terbentuk *insitu* pada permukaan gigi, dengan komposisi kimia sebagai pada tabel 2.1. Komponen dalam plak yang mempunyai daya perekat adalah WIG (*water insoluble glucan*) atau disebut juga polisakarida larut alkali. WIG adalah glukukan (polimer glukosa) yang memiliki ikatan α -1,3 sebagai rantai-rantai utama (panjang) dan ikatan α -1,6 sebagai rantai pendek (Slots, Taubman, 1992; Cury et al., 2000).

Tabel 2.1. Komposisi plak gigi (Cury et al., 2000)

Komposisi	Kontrol, n =11	Glukosa +fruktosa, n = 12	Sukrosa, n =12
Berat kering, mg	4,5 ± 2,2	7,3 ± 1,2	13,2 ± 2,1
Fluorida, µg/g	140,6 ± 30,8	27,4 ± 15,9	5,6 ± 2,2
Fosfor, mg/g	11,5 ± 2,08	0,5 ± 0,14	0,3 ± 0,04
Kalsium, mg/g	17,0 ± 2,75	1,9 ± 0,69	0,6 ± 0,08
Glukan WIG, mg/g	6,5 ± 1,0	11,8 ± 1,9	35,0 ± 7,8
Protein, mg/g	2,3 ± 0,09	1,5 ± 0,18	1,4 ± 0,20

2.2. Enzim Glukosiltransferase dan Produk Reaksinya

Glukosiltransferase merupakan enzim ekstrasel dihasilkan oleh *Streptococcus*, yang mengkatalis reaksi sintesis glukukan dari sukrosa. Glukosiltransferase mengkatalisis transfer residu glukosil yang berasal dari pemecahan sukrosa. Sintesis berbagai produk oleh glukosiltransferase tergantung pada aseptor unit-unit glukosil yang ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Reaksi-reaksi yang dikatalisis oleh enzim glukosiltransferase (Monchois *et al.*, 1999)

Reaksi-reaksi yang terlibat dalam transfer unit-unit glukosil oleh enzim glukosiltransferase, meliputi (gambar 1):

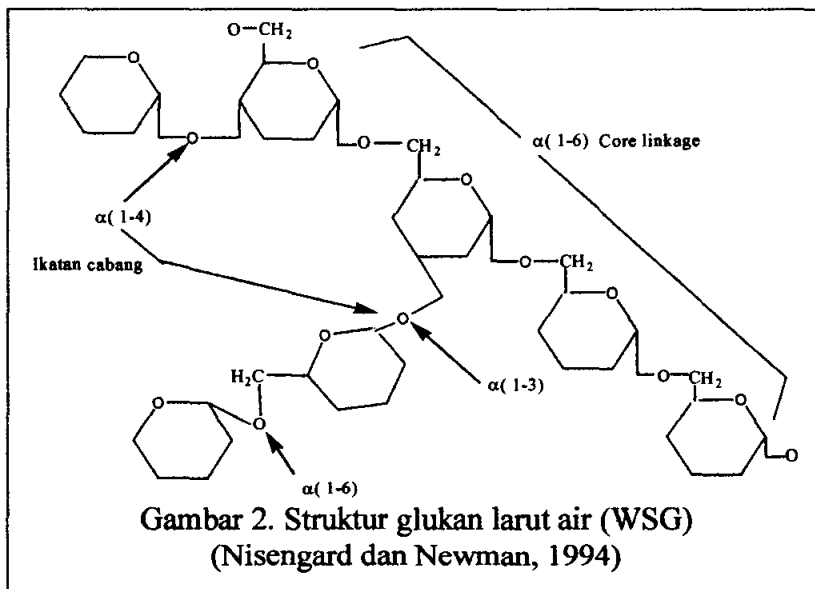
1. Sintesis glukan oleh transfer unit-unit glukosil secara berurutan.
2. Hidrolisis sukrosa dan transfer unit glukosil ke air.
3. Sintesis oligosakarida oleh transfer unit glukosil dalam molekul aseptor.
4. Perubahan isotopik oleh reaksi balik dari bentuk kompleks glukosa-enzim.

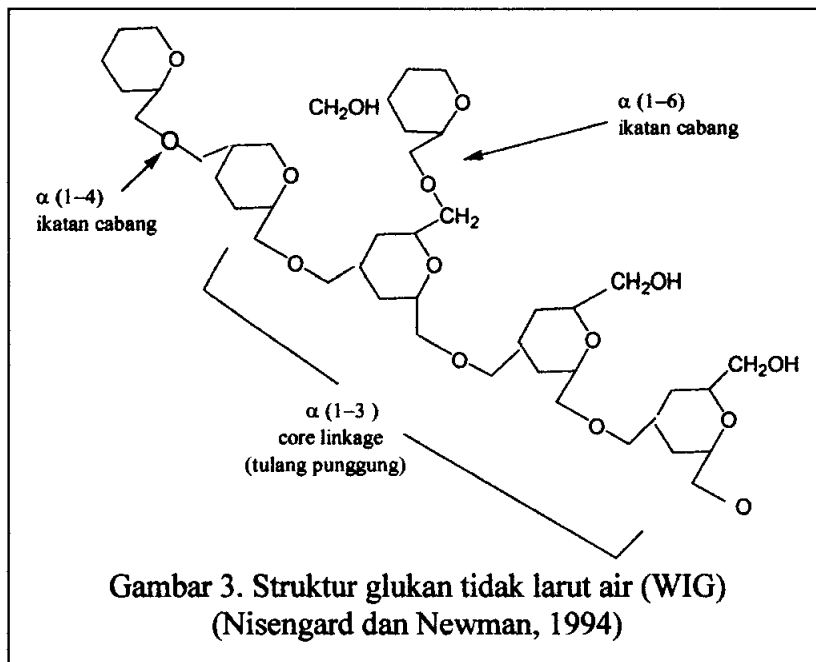
Berdasarkan ikhtisar reaksi glukosiltransferase pada gambar 1 dimengerti bahwa enzim glukosiltransferase dapat mengkatalisis pembentukan glukan bebas maupun glukan yang menempel pada suatu aseptor. Pada reaksi pembentukan glukan bebas harus diawali dengan pengikatan sukrosa (sebagai aseptor glukosa) oleh enzim glukosiltransferase, kemudian unit-unit glukosa akan diikat membentuk glukan bebas. Glukan yang menempel pada aseptor protein di dinding sel bakteri berperan sebagai agregator antar sel-sel bakteri. Sedang glukan bebas menempel pada permukaan gigi, sebagai perekat bagi agregat bakteri di permukaan gigi.

Setiap enzim glukosiltransferase memiliki karakteristik yang berbeda-beda dalam menghasilkan glukan. Glukosiltransferase dari *S. salivarius* pada umumnya

menghasilkan glukukan yang didominasi (95%) ikatan glikosida α -1,6, sedangkan glukukan *S. mutans* didominasi ikatan glikosida α -1,3 (Monchois *et al.*, 1999).

Glukan yang dihasilkan oleh *S. salivarius* dan *S. mutans* berupa WSG (*water soluble glucan*) dan WIG (*water insoluble glucan*). WSG merupakan glukukan kaya ikatan glikosida α -1,6 yang bersifat larut air sehingga mudah berdifusi keluar dari plak menuju saliva. Sedangkan WIG memiliki struktur yang lebih besar karena porsi ikatan α -1,3 pada percabangan lebih banyak. Semakin banyak percabangan dalam struktur glukukan maka terdapat semakin banyak ikatan silang dan berat molekul semakin besar, sehingga terbentuk struktur yang sulit larut dalam air. Glukan yang sulit atau tidak larut dalam air berwujud padatan lunak yang menempel pada permukaan-permukaan keras dalam rongga mulut, salah satunya menempel pada permukaan gigi sebagai plak gigi (Ebisu *et al.*, 1974). Kelarutan glukukan juga ditentukan oleh porsi ikatan glikosida α -1,6 dan α -1,3. Apabila jumlah ikatan α -1,3 lebih besar daripada ikatan α -1,6, maka glukukan sulit larut dalam air. Struktur kedua jenis glukukan tersebut dapat ditunjukkan pada gambar 2 dan gambar 3.





WSG yang terdapat dalam saliva dapat dikonversi menjadi WIG oleh enzim dekstranase yang dihasilkan oleh mikroorganisme rongga mulut. Enzim dekstranase menghidrolisis ikatan glikosida α -1,6 pada WSG saliva yang berakibat porsi ikatan glikosida α -1,3 menjadi lebih besar, sehingga glukun menjadi tidak larut terusir dari cairan saliva menuju permukaan gigi.

2.3. Inhibitor enzim glukosiltransferase

Inhibitor glukosiltransferase adalah senyawa kunci yang dapat digunakan untuk meniadakan karies gigi dengan cara menghambat pembentukan glukun plak gigi. Tanpa glukun ini (WIG) mikroorganisme rongga mulut tidak dapat menempel pada permukaan gigi. Dengan demikian tidak akan terjadi karies gigi, yang merupakan akibat demineralisasi gigi oleh asam yang berasal dari fermentasi oleh mikroorganisme. Propolis, produk lebah yang menyerupai resin, telah dibuktikan

dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme rongga mulut serta menghambat aktivitas enzim glukosiltransferase (Koo, 2002).

Wright et al. (2002) mengidentifikasi beberapa senyawa inhibitor glukosiltransferase, meliputi acarbose, deksinojirimisin, N-dodesildeksinojirimisin dan tris yang dapat digunakan secara *in vivo* dengan aman untuk menghambat pembentukan glukosa.

Bahan-bahan alam yang potensial sebagai bahan anti karies gigi dapat digali berdasarkan penggunaan bahan secara tradisional di Indonesia untuk membersihkan dan menjaga gigi dari karies. Bahan tersebut meliputi komponen penyusun *kinangan* dan siwak. Komponen penyusunan *kinangan* meliputi daun sirih, pinang, buah gambir, dan tembakau.

2.4. Enzim glukonase

Enzim glukonase (dekstranase dan mutanase) merupakan enzim industri yang penting, karena enzim ini dapat menghidrolisis beberapa jenis polimer glukosa yang berasal dari deposit mikroorganisme penyebab timbulnya berbagai bentuk gangguan di industri gula maupun di rongga mulut. Glukosa di industri gula menyebabkan penurunan efisiensi produksi gula. Glukosa di rongga mulut menyebabkan timbulnya karies gigi.

Telah dilakukan eksplorasi enzim penghidrolisis glukosa yang terdapat di pabrik gula, dan telah ditemukan berbagai isolat baru yang potensial sebagai sumber enzim penghidrolisis dekstran di industri gula (Murdiyatmo, 1996; Baktir et al., 2005 ;Baktir dan Murdiyatmo, 2003). Salah satu dari isolat tersebut telah diisolasi gennya (Baktir et al., 2006), yang selanjutnya akan di-subklon untuk produksi enzim dekstranase secara besar-besaran untuk keperluan industri gula.

Fakta bahwa glukon merupakan komponen plak gigi yang menyebabkan karies gigi, telah menjadi pendorong utama studi tentang enzim dekstranase dan mutanase. Di samping itu enzim dekstranase juga digunakan untuk memodifikasi dekstran menjadi produk untuk berbagai aplikasi bioteknologi medis maupun non-medis.



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Bahan dan Alat Penelitian

3.1.1. Bahan penelitian

Sampel penelitian berupa: (1) tanah sebagai sumber mikroorganisme yang dapat menghidrolisis glukukan, diambil di daerah yang diperkirakan mengandung glukukan. (2) Saliva dan hapusan karies gigi sebagai sumber bakteri penghasil glukosiltransferase, diambil dari rongga mulut manusia. 3) Bahan-bahan komponen *kinangan* (daun sirih, buah gambir, pinang, tembakau), siwak dan propolis.

Bahan kimia yang digunakan adalah BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*), TYC (*Trypticase Yeast Cistine*), *gas pack*, dan agarosa, ekstrak ragi, natrium klorida, *phenol red*, sukrosa, manitol, sorbitol, laktosa, arginin, natrium bifosfat, dan pepton, bufer fosfat, asam perklorat, L-sistein, karbazol, fruktosa dan asam fosfat.

3.1.2. Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium Biokimia, HPLC beserta detektor dan kolomnya untuk glukukan, lembar silika gel, isopropanol, etil asetat, pipet mikro, *laminar air flow cabinet*, inkubator 37 °C, *candle jar* (cungkup lilin), *rotary shaker* dan spektrofotometer UV/VIS.

3.2. Cara Kerja

3.2.1. Isolasi dan kultivasi mikroba penghasil glukosiltransferase

Mikroba penghasil enzim glukosiltransferase ditumbuhkan dan diisolasi dari saliva dan hapusan/kerokan karies gigi di rongga mulut manusia menurut cara Ebisu

et al. (1975). Pengambilan saliva dan hapusan karies gigi dilakukan secara aseptis, kemudian dikultivasi masing-masing dalam media cair BHIB steril dalam tabung reaksi di dalam cangkup lilin 37 °C selama 24 jam. Biakan yang diperoleh ditumbuhkan pada media padat TYC. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dalam jar anaerob yang di dalamnya dilengkapi dengan *gas pack*. Selanjutnya dilakukan identifikasi *S. mutans* dan *S. salivarius* terhadap koloni yang diperoleh berdasarkan kemampuannya menggunakan bahan-bahan berikut, meliputi sukrosa, manitol, sorbitol, laktosa dan arginin.

Isolat *S. mutans* dan *S. salivarius* yang didapat ditumbuhkan masing-masing dalam media cair BHIB dalam labu Erlenmeyer 50 mL di dalam cangkup lilin selama 24 jam, sehingga didapat inokulum.

3.2.2. Pola produksi enzim glukosiltransferase

Inokulum sebanyak 1 % (b/b) ditambahkan ke media cair BHIB sebanyak 150 mL dalam labu Erlenmeyer 250 mL, kemudian diinkubasi dalam cangkup lilin pada suhu 37°C selama 24 jam. Dilakukan pengambilan sampel biakan cair setiap selang waktu 3 jam, kemudian sampel disentrifuga. Terhadap supernatan yang diperoleh dilakukan pengukuran aktivitas glukosiltransferase sesuai dengan metode Koo et al. (2002).

3.2.3. Produksi enzim glukosiltransferase

Dilakukan prosedur menumbuhkan *S. mutans* dan *S. salivarius* seperti pada prosedur sebelumnya (butir 6.2.2) tetapi tanpa pengambilan sampel. Panen biakan cair dilakukan pada saat aktivitas enzim glukosiltransferase maksimum, sesuai data pola

produksi enzim glukosiltransferase di butir 6.2.2. Biakan cair ini disentrifuga, supernatannya merupakan ekstrak kasar glukosiltransferase.

3.2.4. Produksi WIG dan WSG

WIG (*water insoluble glucan*) diproduksi dari sukrosa menggunakan ekstrak kasar glukosiltransferase dari *S. mutans*, sedang WSG (*water soluble glucan*) diproduksi dari sukrosa menggunakan ekstrak kasar glukosiltransferase dari *S. salivarius*. Metode produksi sesuai dengan Ebisu et al. (1974).

WIG dan WSG yang didapat dimurnikan menurut metode Cury et al. (2000). Kemudian glukannya ini dikarakterisasi dengan cara melarutkan glukannya yang didapat dalam akuades dan NaOH 0,1 M, kemudian disentrifuga, dan ditentukan profil KLT (Kromatografi Lapisan Tipis) dari supernatan yang didapat. Pada KLT digunakan fasa gerak campuran isopropanol, etil asetat dan air dengan perbandingan 70:20:10, serta reagen penampak noda terdiri H₂SO₄ 5% (v/v) dan α -naftol 0,5% dalam etanol.

3.2.5. Penapisan bakteri penghasil enzim dekstranase dan mutanase

Bakteri yang dapat mengasimilasi WIG dan WSG diisolasi dari tanah menggunakan metode Okushima et al. (1991), yang menggunakan dua jenis medium. Medium I terdiri dari (b/v) 0,1% (NH₄)₂SO₄, 0,0005% MgSO₄·7H₂O, 0,0005% FeCl₂·6H₂O, 0,1% KH₂PO₄, 0,1% Na₂HPO₄·12H₂O, 0,02% ekstrak ragi dan 0,2 % WSG. Medium II terdiri dari garam-garam dan ekstrak ragi seperti medium I, 0,2 % WIG dan 1,5% agar.

Medium I steril sebanyak 5 mL ditambah sampel tanah 0,3 gram dalam labu Erlenmeyer 25 mL, kemudian dikocok pada *rotary shaker* 125 rpm pada 28 °C selama 3 hari. Biakan yang didapat diencerkan 25 kali dengan medium yang sama, kemudian

dikocok dengan cara yang sama. Perlakuan ini diulang sampai 5 kali, kemudian biakan cair yang dihasilkan ditanam pada medium padat: (a). Medium I padat dan (b) Medium II selama 24 jam. Koloni yang memberikan daerah *halo* di sekitarnya pada medium I adalah bakteri penghasil enzim dekstranase, sedang koloni yang memberikan daerah *halo* pada medium II adalah bakteri penghasil enzim mutanase.

3.2.6. Uji beberapa bahan sebagai inhibitor glukosiltransferase

Aktivitas inhibitor glukosiltransferase ditentukan berdasarkan metode Koo et al. (2002). Masing-masing bahan uji inhibitor (sirih, pinang, gambir, tembakau, siwak) dibuat serbuk, kemudian dilakukan maserasi menggunakan pelarut air. Dibuat seri pengenceran dari maserat induk yang didapat, yaitu 100% (maserat induk), 75%, 50%, 25%, 1%, 0%. Setiap 0,1 mL larutan bahan uji tersebut ditambahkan 0,1 mL ekstrak glukosiltransferase, setelah dikocok ditambahkan 0,1 mL larutan sukrosa 100mM dan 0,3 ml bufer pH 6,5 yang mengandung 50 mM KCl, 1 mM CaCl₂ dan 0,1 mM MgCl₂. Larutan diinkubasi pada suhu 37°C dengan penggojokan selama 4 jam. Kemudian ditambahkan etanol absolut dingin 2 kali volume akhir, dihomogenkan dan disentrifuga. Dilakukan penentuan kadar fruktosa pada supernatan dengan metode sistein karbazol. Uji efek inhibitor setiap larutan sampel ditentukan berdasarkan berkurangnya aktivitas glukosiltransferase (1U glukosiltransferase = jumlah enzim yang membebaskan 10 mg fruktosa per ml per jam pada kondisi percobaan).

Percobaan blangko dilakukan dengan cara yang sama, tetapi bahan uji diganti dengan etanol (kadar akhir 5%). Sedangkan sebagai pembanding daya inhibisi bahan uji, digunakan propolis.

BAB 4

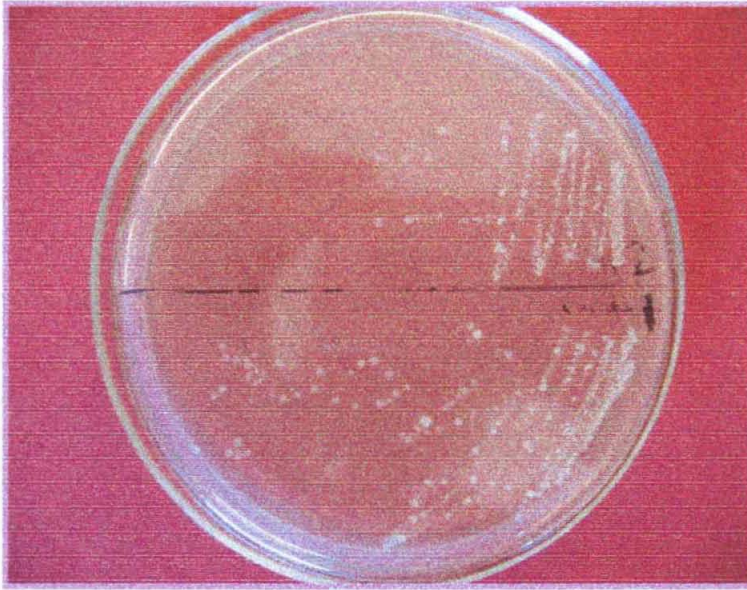
HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi dan identifikasi *Streptococcus mutans*

Berdasarkan penyebab terjadinya karies gigi yang telah diuraikan pada bab sebelumnya, maka *S. mutans* dapat dipastikan terdapat di karies gigi, sehingga pada penelitian ini sampel untuk isolasi *S. mutans* berupa hapusan/kerokan karies gigi.

Streptococcus adalah mikroorganisme anaerob. Kondisi anaerob untuk menumbuhkan bakteri ini dicapai dengan dua macam teknik pada penelitian ini, yaitu teknik jar anaerob yang dilengkapi dengan *gas pack* dan teknik cungkup lilin (*candle jar*). Pemakaian jar anaerob yang dilengkapi dengan *gas pack* menghasilkan kondisi yang benar-benar anaerob. Sedangkan cungkup lilin hanya mampu mengusir sebagian besar gas oksigen dalam tabung eksikator, akan tetapi kondisi yang dihasilkan tidak sama sekali bebas oksigen. Pada teknik cungkup lilin digunakan nyala api lilin yang akan menggunakan gas oksigen yang terdapat dalam tabung eksikator. Ruangan bagian bawah tabung eksikator diberi kapur yang berfungsi agar bereaksi dengan oksigen. Nyala api lilin sekaligus berfungsi sebagai indikator, apabila nyala api lilin mati menandakan gas oksigen habis. *S. mutans* merupakan jenis bakteri kemoorganotrof sehingga memerlukan media kaya nutrisi untuk pertumbuhan dengan penambahan 5% CO₂ (Holt, John G *et.al.*,2000).

Streptococcus mutans merupakan bakteri anaerob fakultatif, keberadaan oksigen tidak mematikannya, akan tetapi dalam kondisi bebas oksigen mikroba ini tumbuh sempurna dengan koloni yang baik dan mudah diidentifikasi. Oleh karena itu pada tahap isolasi dan identifikasi *S. mutans* digunakan jar anaerob yang dapat menghasilkan lingkungan yang benar-benar anaerob.



Gambar 4.1 Isolat *S. mutans* pada media padat TYC

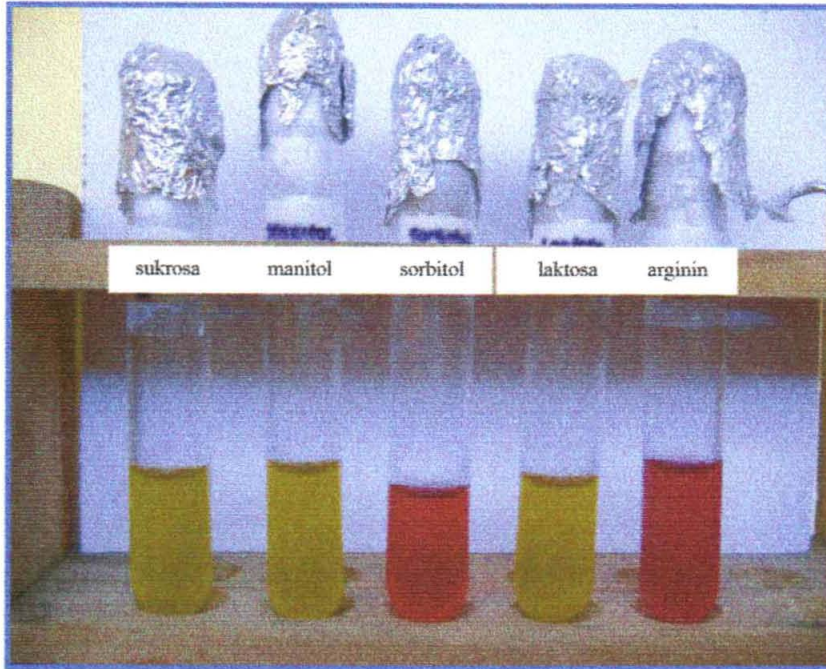
Koloni yang diduga *S. mutans* atas dasar morfologinya (gambar 4.1), selanjutnya diuji secara biokimia dengan cara ditumbuhkan pada berbagai jenis substrat. Uji biokimia ini dimaksudkan untuk memastikan bahwa koloni tersebut adalah *S. mutans*. Adapun substrat yang digunakan untuk uji biokimia meliputi sukrosa, manitol, sorbitol, laktosa, dan arginin (Maiden, *et al.*, 1992).

Tabel 4.1 Uji biokimia bakteri *S. mutans*

No	Jenis Substrat	Hasil Fermentasi
1.	Sukrosa	+
2.	Manitol	+
3.	Sorbitol	±
4.	Laktosa	+
5.	Arginin	-

Keterangan : + artinya fermentasi positif
 - artinya fermentasi negatif

Hasil uji biokimia dengan menggunakan berbagai jenis substrat disajikan di tabel 4.1 dan gambar 4.2.

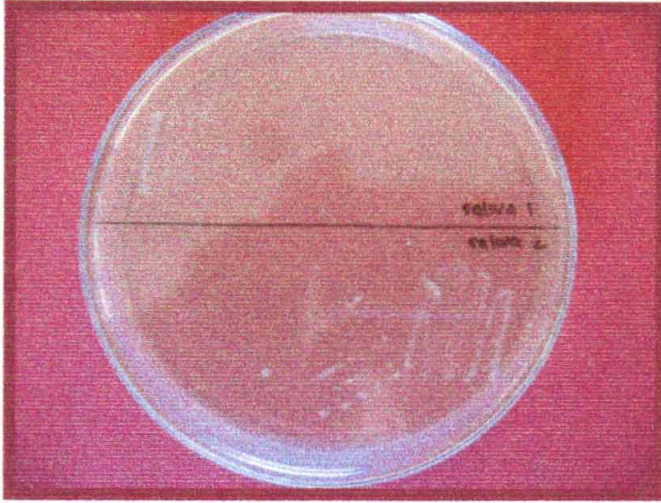


Gambar 4.2 Hasil uji biokimia *S. mutans* dengan menggunakan berbagai jenis substrat

4.2. Isolasi dan identifikasi *S. salivarius*

S. salivarius merupakan mikroorganisme normal yang hidup dalam rongga mulut manusia. Dalam penelitian ini dilakukan isolasi *S. salivarius* dari saliva manusia yang dibiakkan dalam media cair BHIB, selanjutnya dipindah ke media padat TYC pada suhu optimum 37°C untuk mengidentifikasi melalui pengamatan bentuk morfologi koloni. Morfologi koloni *S. salivarius* pada media padat yang mengandung sukrosa adalah putih dan halus (Slots dan Taubman, 1992). Dalam penelitian ini koloni yang berbentuk putih dan *smooth* diseleksi. Isolat yang diduga sebagai *S. salivarius* dikarakterisasi secara biokimia dengan beberapa senyawa organik. Berdasarkan uji biokimia ini dapat dipastikan bahwa koloni yang diambil

adalah isolat murni *S. salivarius*. Hasil isolat *S. salivarius* pada media padat TYC ditunjukkan pada gambar 4.3.



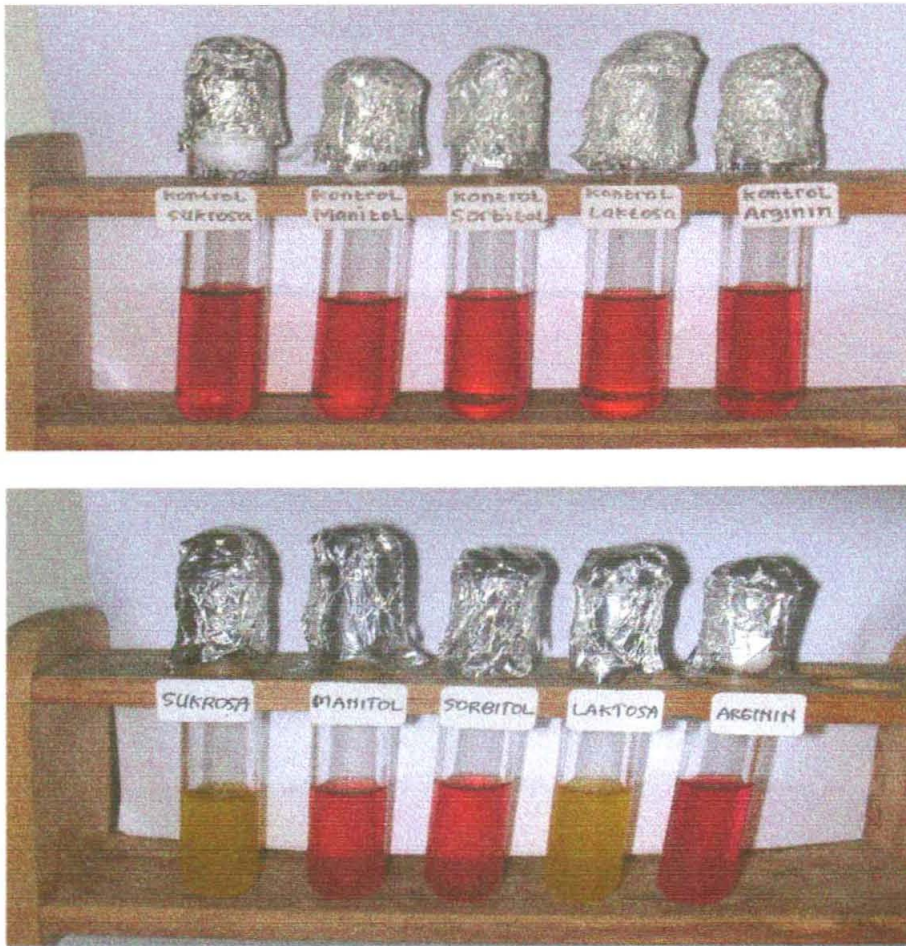
Gambar 4.3 Isolat *S. salivarius* pada media padat TYC

Hasil karakterisasi isolat *S. salivarius* melalui uji biokimia disajikan di tabel 4.2 dan gambar 4.4. Setiap tabung uji biokimia mengandung indikator merah fenol dimana pada suasana basa berwarna merah dan suasana asam berwarna kuning. Media uji biokimia ini pada awal sebelum terjadi proses fermentasi biakan *S. salivarius* mempunyai pH 7,6 sehingga media uji biokimia berwarna merah.

Tabel 4.2 Hasil Karakterisasi *S. salivarius*

Karakterisasi	<i>S. salivarius</i>
Fermentasi : <ul style="list-style-type: none"> • Mannitol • Sorbitol • Laktosa 	negatif negatif positif
Hidrolisis : <ul style="list-style-type: none"> • Arginin 	negatif
Polimer dari sukrosa : <ul style="list-style-type: none"> • Glukan 	positif

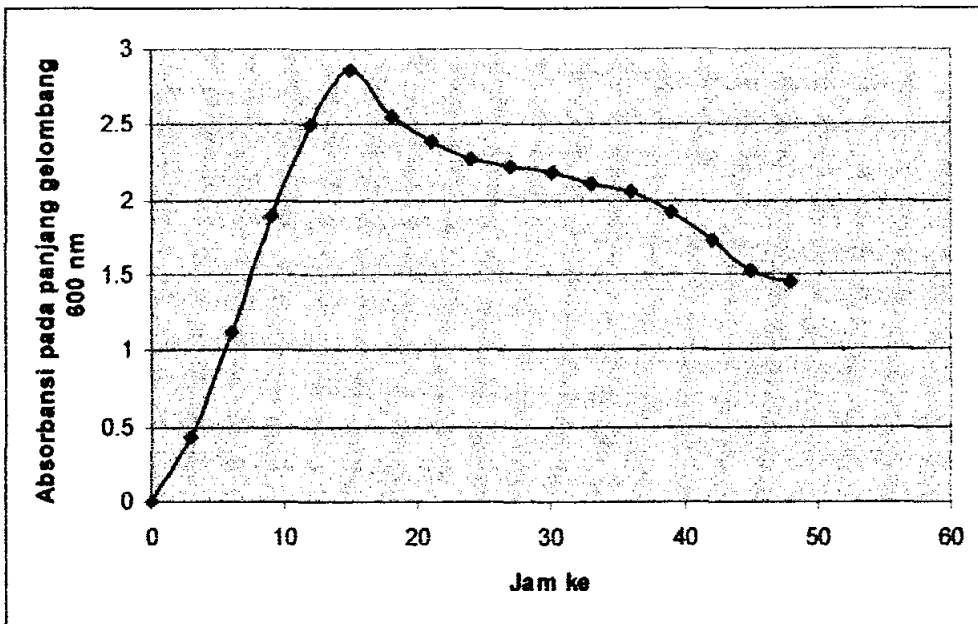
Keterangan : Uji positif : perubahan warna dari merah menjadi kuning.
 Uji negatif : warna tetap merah.



Gambar 4.4. Hasil uji biokimia *S. salivarius* terhadap beberapa senyawa organik.

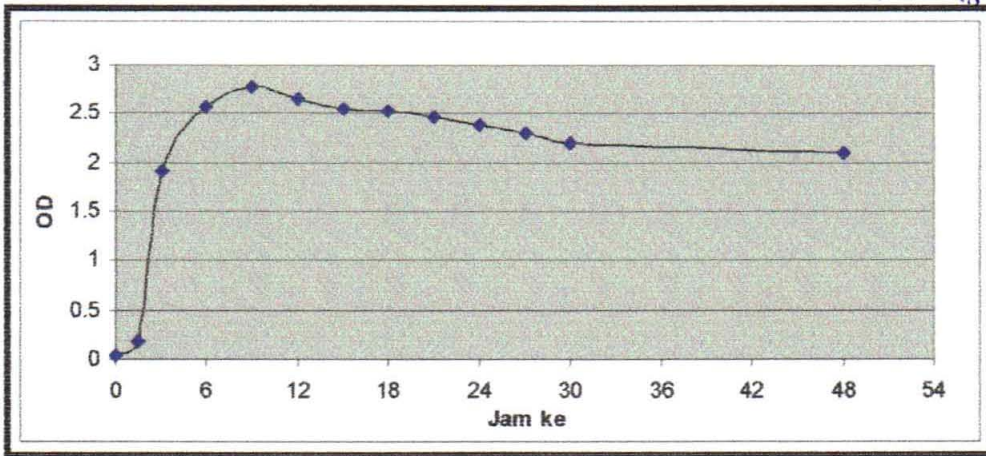
4.3. Kultivasi *S. mutans* dan *S. salivarius*

Kurva pertumbuhan *S. mutans* hasil isolasi dari karies gigi yang diperoleh pada penelitian ini terdapat pada gambar 4.5. Kurva tersebut tidak menunjukkan Fase Lag atau Fase Adaptasi. Fase Logaritmik dinamakan juga Fase Eksponensial, yaitu fase dimana sel membelah dengan kecepatan maksimum yang konstan (Schlegel, 1994). Jam ke 15 merupakan titik maksimum pertumbuhan, kemudian pertumbuhan sel mulai menurun dan terjadi lisis sel yang ditandai dengan menurunnya grafik pada kurva pertumbuhan tanpa mengalami Fase Stasioner.



Gambar 4.5 Kurva pertumbuhan *S. mutans*

Kurva pertumbuhan *S. salivarius* dapat dilihat pada gambar 4.6. Pada kurva tidak tampak fase Lag (fase adaptasi), melainkan langsung menunjukkan fase pertumbuhan awal. Hal ini terjadi karena media pertumbuhan yang digunakan telah dikenali oleh biakan dengan cara membiakkan secara seri. Setelah Fase Pertumbuhan awal, tampak Fase logaritmik yang terjadi mulai jam ke 1,5 hingga jam ke 6 seperti terlihat pada gambar 4.6, yaitu sel membelah dengan cepat dan konstan. Pada jam selanjutnya, terjadi penurunan densitas optik suspensi sel, yang menunjukkan bahwa sel mulai lisis yang akan berakibat pada kematian. Fase ini disebut sebagai fase menuju kematian atau fase kematian.



Gambar 4.6 Pola pertumbuhan *S. salivarius* pada $\lambda_{600\text{ nm}}$

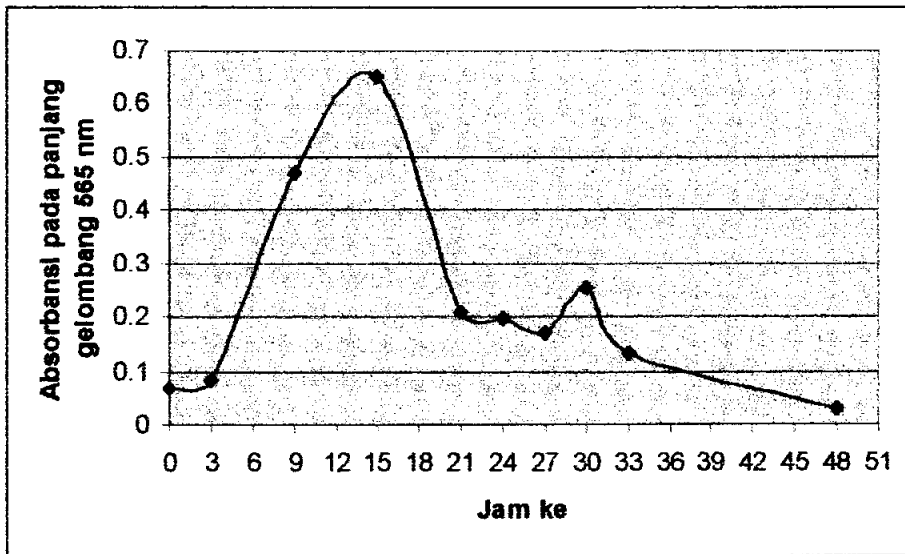
Dari pola pertumbuhan yang didapat diketahui bahwa panen sel *S. salivarius* dapat dilakukan pada saat umur biakan 3 jam. Pada saat itu biakan *S. salivarius* berada pada fase logaritmik, yaitu sel membelah dengan cepat dan konstan, yang tergantung pada medium tempat tumbuhnya seperti kandungan nutrisi juga kondisi lingkungan termasuk suhu, kelembaban udara, dan pH (Fardiaz, 1992).

Pengukuran jumlah sel pada penelitian ini melalui penentuan densitas optik suspensi sel menggunakan alat spektrofotometer UV/VIS, berdasarkan metode turbidimetri. Pada metode ini jumlah sel dalam suspensi berbanding lurus dengan hamburan cahaya pada panjang gelombang 600 nm (Judoamidjojo dkk, 1992).

4.4. Pola Produksi Enzim Glukosiltransferase oleh *S. mutans* dan *S. salivarius*

Glukosiltransferase merupakan enzim yang mengkatalisis transfer residu glukosil yang berasal dari pemecahan sukrosa sehingga dihasilkan senyawa polimer yang disebut glukan dan dibebaskan monomer fruktosa. Aktivitas enzim glukosiltransferase dapat diidentifikasi dari jumlah fruktosa yang dilepaskan pada reaksi katalitik oleh enzim glukosiltransferase terhadap substrat sukrosa (Mooser, 1992).

Data pola produksi enzim glukosiltransferase oleh *S. mutans* dalam media produksi BHIB terdapat pada gambar 4.7.



Gambar 4.7 Pola produksi enzim glukosiltransferase oleh *S. mutans* dalam media produksi BHIB

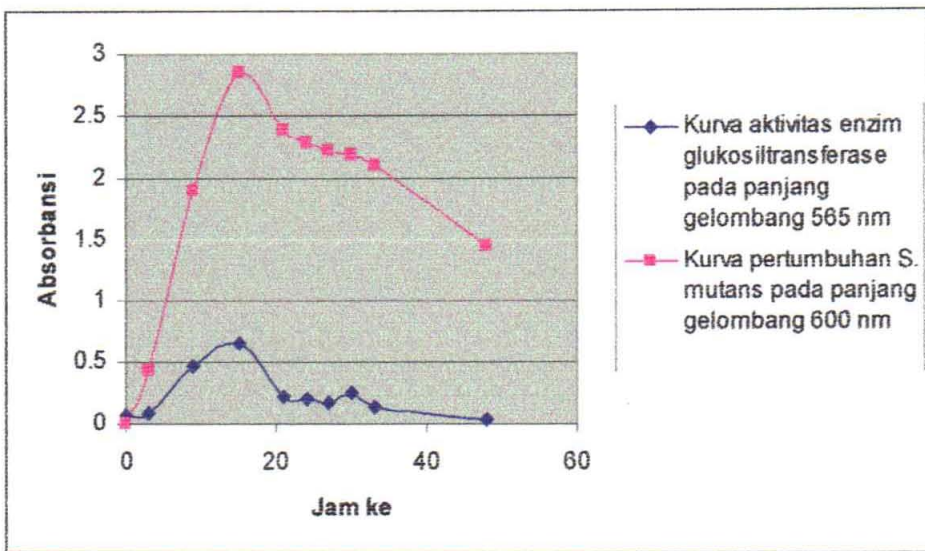
Pada gambar 4.7 tampak ada 2 buah puncak aktivitas enzim glukosiltransferase selama proses fermentasi oleh *S. mutans*, puncak pertama pada jam ke 15 dan puncak kedua pada jam ke 30 proses fermentasi. Hal ini menunjukkan ada dua jenis glukosiltransferase yang dihasilkan oleh *S. mutans*. Pada kedua profil puncak tersebut tampak terjadi penurunan aktivitas yang tajam setelah aktivitas mencapai titik maksimum. Penurunan aktivitas kedua jenis enzim glukosiltransferase ini dapat disebabkan oleh beberapa hal berikut :

1. enzim glukosiltransferase tidak stabil pada kondisi selama produksi
2. enzim glukosiltransferase mengalami deaktivasi oleh produk metabolisme
3. enzim glukosiltransferase dihidrolisis oleh protease intraselular

Enzim glukosiltransferase merupakan enzim ekstraselular, ada yang dilepas secara sempurna dari sel (*cell free glucosyltransferase*) dan ada pula yang terikat pada membran sel *S. mutans* (*cell associated glucosyltransferase*) (Nakahara, 1993).

Puncak pertama pada kurva gambar 4.5 merupakan puncak enzim glukosiltransferase yang dilepas secara sempurna dari sel, sedangkan puncak kedua merupakan puncak enzim glukosiltransferase yang terikat sebagian pada membran sel *S. mutans*.

Hubungan kurva pertumbuhan *S. mutans* dengan kurva aktivitas enzim glukosiltransferase yang ditunjukkan oleh gambar 4.8, dapat memberikan jawaban sementara atas terjadinya penurunan aktivitas enzim glukosiltransferase yang tajam selama proses fermentasi.

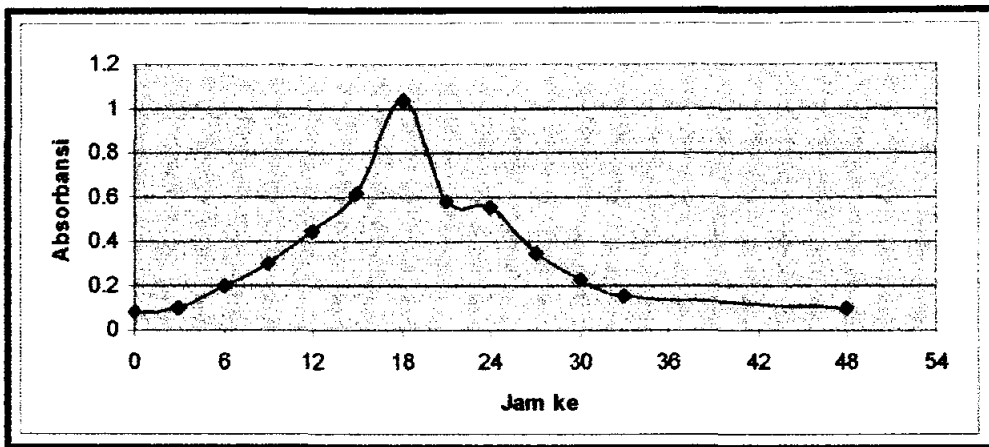


4.8 Hubungan kurva pertumbuhan *S. mutans* dengan aktivitas enzim glukosiltransferase

Pada gambar 4.8 tampak bahwa puncak pertama aktivitas enzim glukosiltransferase terjadi pada titik yang sama dengan puncak pertumbuhan sel. Pada jam ke 15 diperoleh Fase Logaritmik pada kurva pertumbuhan *S. mutans*. Pada fase ini diperoleh aktivitas enzim glukosiltransferase yang maksimum sehingga pada uji aktivitas enzim glukosiltransferase diperoleh absorbansi tertinggi. Selanjutnya pertumbuhan mikroorganisme mengalami penurunan sehingga aktivitas enzim glukosiltransferase juga mengalami penurunan. Ketika sel lisis maka protein intraseluler terlepas dalam medium bercampur dengan enzim glukosiltransferase.

Salah satu protein intraselular tersebut diduga berupa protease intraselular, yang merupakan salah satu faktor terkuat penyebab penurunan aktivitas enzim glukosiltransferase. Protease merupakan enzim yang mempunyai daya katalitik terhadap ikatan peptida pada protein atau polipeptida menjadi molekul yang lebih kecil (Godfrey dan Reichelt, 1983).

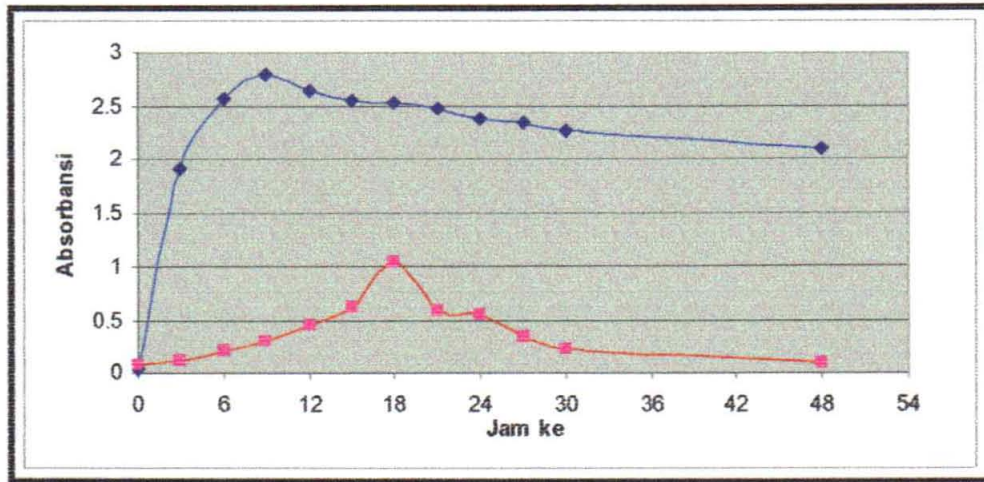
Pola produksi enzim glukosiltransferase yang dihasilkan oleh *S. salivarius* pada biakan cair BHIB selama produksi enzim gtf terdapat pada gambar 4.9.



Gambar 4.9. Pola produksi enzim glukosiltransferase oleh *S. Salivarius*

Dari data hasil penelitian pada gambar 4.9 diperoleh bahwa waktu optimum untuk memanen enzim gtf, yaitu pada jam ke 18.

Hubungan kurva pertumbuhan *S. salivarius* dengan kurva aktivitas enzim gtf ditunjukkan oleh gambar 4.10.



Gambar 4.10 Hubungan Pola pertumbuhan *S. salivarius* (biru) dengan Pola produksi enzim glukosiltransferase (merah).

Aktivitas enzim gtf meningkat seiring dengan peningkatan jumlah sel *S. Salivarius*, dan menunjukkan titik optimum pada jam ke 18. Setelah jam ke 18, pada saat sel mulai lisis, aktivitas enzim gtf mengalami penurunan yang tajam seiring dengan lisisnya sel. Ketika sel lisis maka protein intrasel terlepas dalam medium bercampur dengan enzim gtf. Salah satu protein intrasel tersebut kemungkinan berupa enzim protease, yang dapat menghidrolisis protein.

4.5. Produksi enzim glukosiltransferase

Biakan cair yang dipanen pada fermentasi oleh *S. mutans* pada jam ke 15 menunjukkan aktivitas sebesar 96,2 U/mL. Ekstrak kasar glukosiltransferase sebanyak 150 mL yang didapat memiliki aktivitas sebesar $14,43 \cdot 10^3$ U.

Biakan cair yang dipanen pada fermentasi oleh *S. salivarius* pada jam ke 18, menunjukkan aktivitas sebesar 166,29 U/mL. Aktivitas total dalam ekstrak kasar 150 mL adalah $24,75 \cdot 10^3$ U

4.6. Produksi dan karakterisasi glukon

4.6.1. Produksi glukon

Glukon diproduksi dengan cara menginkubasi campuran sukrosa, glukosiltransferase dan primer T6 pada kadar tertentu. Glukosiltransferase yang digunakan adalah dua jenis glukosiltransferase dari *S. mutans*, yaitu glukosiltransferase ekstrasel (glukosiltransferase E) dan glukosiltransferase *cell associated* (glukosiltransferase CA).

Dilakukan optimasi produksi glukon dengan melakukan variasi waktu inkubasi dan kadar sukrosa. Data produksi glukon dengan menggunakan glukosiltransferase CA dan glukosiltransferase E berturut-turut disajikan di tabel 4.3 dan 4.4. Glukon yang dihasilkan berwujud kekeruhan yang ditentukan dengan cara pengukuran OD pada panjang gelombang 550 nm.

Tabel 4.3. Data optimasi kadar sukrosa dan waktu inkubasi pada produksi glukon dari glukosiltransferase E

Kadar sukrosa (%)	Ulangan	OD (550 nm) pada waktu inkubasi (hari ke)			
		1	3	5	7
5	1	0,074	0,144	0,129	0,129
	2	0,096	0,153	0,152	0,130
10	1	0,069	0,132	0,179	0,180
	2	0,063	0,125	1,195	0,190
15	1	0,057	0,124	0,140	0,140
	2	0,063	0,115	0,167	0,164
20	1	0,030	0,091	0,075	0,070
	2	0,033	0,076	0,063	0,065

Tabel 4.4. Data optimasi kadar sukrosa dan waktu inkubasi pada produksi glukon dari glukosiltransferase CA

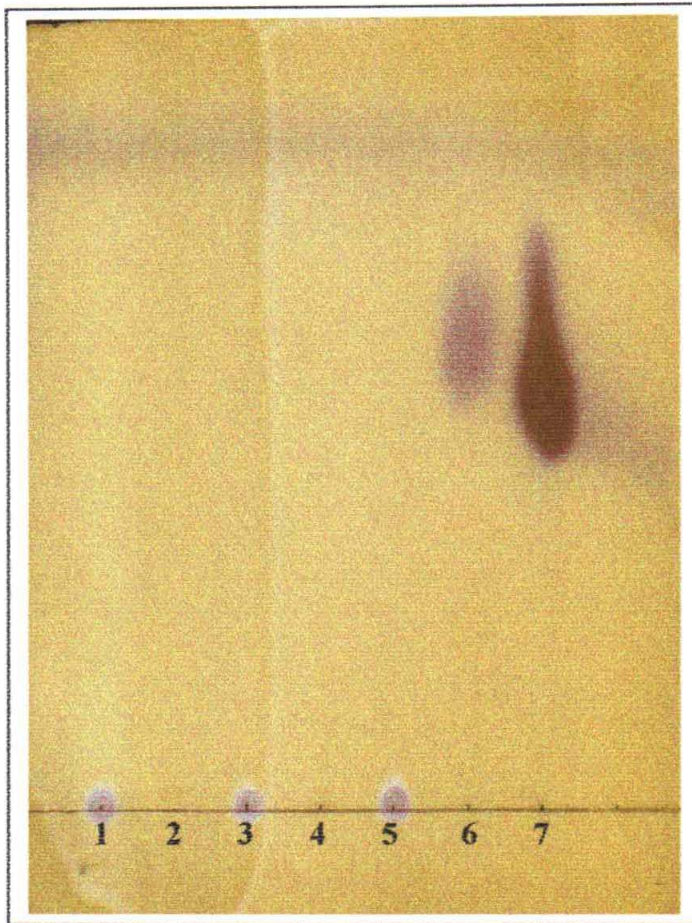
Kadar sukrosa (%)	Ulangan	OD (550 nm) pada waktu inkubasi (hari ke)		
		1	3	5
5	1	0,370	0,420	0,410
	2	0,380	0,340	0,340
10	1	0,180	0,280	0,281
	2	0,210	0,210	0,208
20	1	0,280	0,190	0,185
	2	0,250	0,090	0,090

Data pada tabel 4.3 menunjukkan bahwa nilai OD pada 550 nm yang tertinggi tampak pada waktu inkubasi 5 hari dan kadar sukrosa 10 %. Selanjutnya dilakukan produksi glukon dari glukosiltransferase E dalam jumlah lebih besar.pada kondisi kadar sukrosa optimum (10%) dan waktu inkubasi optimum (5 hari), dan didapat glukon berat kering 66 mg.

Data optimasi produksi glukon pada tabel 4.4 menunjukkan kondisi optimum waktu inkubasi 3 hari dan kadar sukrosa 5%. Produksi glukon dari glukosiltransferase CA pada kondisi optimum tersebut menghasilkan glukon sebanyak 100 mg.

4.6.2. Karakterisasi glukon

Karakterisasi glukon yang dilakukan dengan cara melarutkan masing-masing glukon yang didapat dalam 0,5 mL air dan 0,5 mL larutan NaOH 0,1 M. Uji kelarutan ini dilakukan dengan cara mengocok glukon dalam pelarut air atau NaOH 0,1 M di atas *rocking shaker* selama 10 menit, kemudian disentrifugasi, supernatan diuji dengan KLT untuk menentukan ada atau tidak adanya glukon terlarut. Hasil uji KLT supernatan terdapat di gambar 4.11.



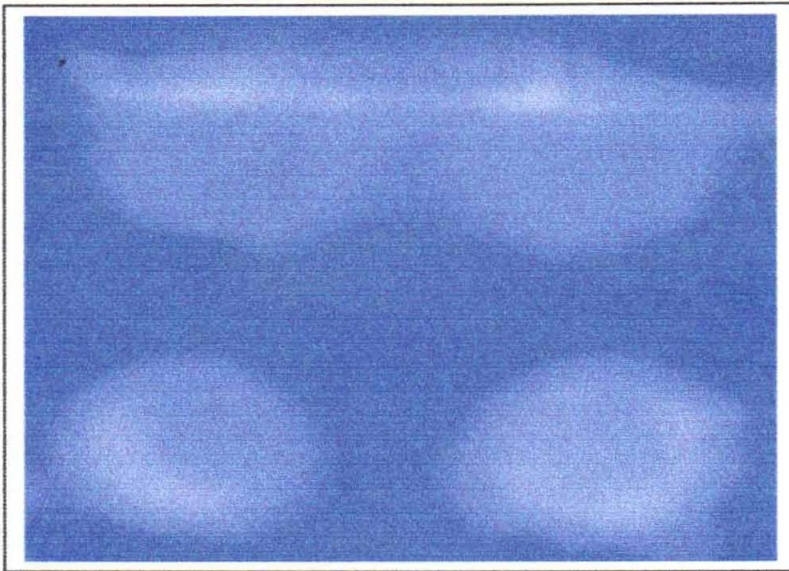
Gambar 4.11. Profil KLT supernatan pada uji kelarutan glukon
 1 = supernatan NaOH 0,1 M(gtf-E); 2= supernatan air (gtf-E); 3= supernatan NaOH 0,1 M (gtf-CA); 4=supernatan air (gtf-CA). 5, 6, dan 7 berturut-turut = standar nigeran (Sigma), glukosa (Sigma) dan sukrosa (Sigma)

Profil KLT supernatan pada gambar 4.11 menunjukkan bahwa pada supernatan hasil uji kelarutan glukon dalam air tidak ditemui noda glukon (lane 2 dan 4). Hal ini menunjukkan bahwa glukon yang didapat pada penelitian ini tidak larut dalam air. Sedang supernatan hasil uji kelarutan glukon dalam larutan NaOH 0,1 M tampak ada noda glukon (lane 1 dan 3), yang berarti bahwa glukon yang didapat larut dalam NaOH 0,1 M. Berdasarkan percobaan uji kelarutan ini dapat disimpulkan bahwa

glukan yang didapat dari glukosiltransferase-E dan glukosiltransferase-CA merupakan glukan tidak larut air (*water insoluble glukan*/WIG).

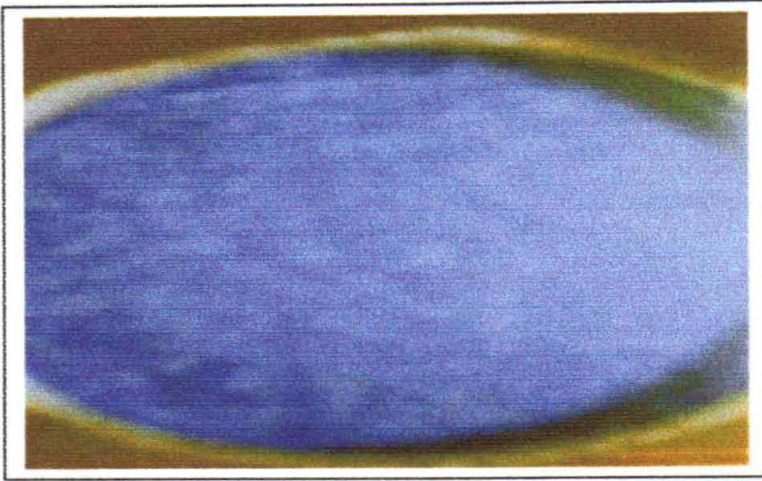
4.7. Penapisan bakteri penghasil enzim glukanase

Penapisan bakteri penghasil enzim glukanase dilakukan dengan menginduksi bakteri yang terdapat dalam sampel tanah dengan induser dekstran selama 15 hari fermentasi dalam media minimal cair. Uji biakan cair yang didapat menunjukkan adanya enzim glukanase sebagai tampak pada gambar 4.12.



Gambar 4.12. Uji kualitatif enzim glukanase pada supernatan biakan cair menggunakan agar dekstran biru

Biakan cair yang menunjukkan *halo* ditumbuhkan dalam media agar dekstran biru, maka diperoleh biakan padat sebagai pada gambar 4.13.



Gambar 4.13. Biakan agar hasil penapisan bakteri penghasil enzim glukonase

Koloni-koloni yang terdapat pada biakan padat di gambar 4.13 adalah bakteri-bakteri penghasil enzim yang dapat menghidrolisis ikatan glikosida α -1,6. Enzim tersebut diduga memiliki aktivitas ganda, yaitu di samping beraktivitas menghidrolisis ikatan glikosidik α -1,6 juga beraktivitas terhadap α -1,3; α -1,4, atau α -1,2. Untuk menapis bakteri penghasil enzim yang menghidrolisis ikatan glikosida α -1,6 dan α -1,3 maka koloni-koloni pada biakan agar (gambar 4.13) dipindahkan ke media agar mengandung glukon tidak larut (WIG) yang didapat pada penelitian ini.

4.8. Uji beberapa bahan sebagai inhibitor glukosiltransferase

Hasil uji komponen *kinangan* (tembakau, jambe dan gambir) terhadap aktivitas glukosiltransferase disajikan di tabel 4.5. Data tersebut menunjukkan bahwa semua komponen *kinangan* yang diuji menunjukkan aktivitas inhibitor bagi enzim glukosiltransferase. Berdasarkan temuan ini maka dapat diduga bahwa kesehatan gigi pada pengguna *kinangan* secara tradisional berhubungan dengan inhibisi pembentukan plak gigi melalui aktivitas inhibitor terhadap enzim glukosiltransferase.

Tabel 4.5. Hasil uji komponen *kinangan* sebagai inhibitor enzim glukosiltransferase

Inhibitor (Komponen kinangan)	Kadar (ppm)	OD pada 550 nm		Kemampuan inhibisi
		Tanpa inhibitor	Dengan inhibitor	
Tembakau	500	0,335	0	+
	250	0,335	0	+
	100	0,335	0	+
	50	0,335	0	+
	10	0,335	0	+
Jambe	500	0,335	0	+
	250	0,335	0	+
	100	0,335	0	+
	50	0,335	0	+
	10	0,335	0	+
Gambir	500	0,335	0	+
	250	0,335	0	+
	100	0,335	0	+
	50	0,335	0	+
	10	0,335	0	+

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Telah diisolasi *Streptococcus salivarius* dan *Streptococcus mutans* dari rongga mulut manusia, dan telah diproduksi ekstrak enzim glukosiltransferase dari kedua isolat tersebut, yang memberikan aktivitas berturut-turut 166,29 U/mL dan 96,20 U/mL.
2. Telah diproduksi dua jenis glukukan dari glukosiltransferase *Streptococcus mutans*, yang menunjukkan karakteristik sebagai WIG (*water insoluble glucan*).
3. Telah didapat koleksi bakteri-bakteri penghasil enzim glukukanase dari tanah, yang memberikan aktivitas glukukanase berupa *halo* di sekitar koloni pada media agar dekstran biru.
4. Komponen *kinangan* (tembakau, jambe dan gambir) memberikan aktivitas inhibitor terhadap enzim glukosiltransferase dari *Streptococcus mutans*.

5.2. SARAN

1. Menapis koleksi yang didapat menggunakan substrat glukukan yang berasal dari *Streptococcus salivarius* maupun *Streptococcus mutans* untuk mendapatkan bakteri penghasil enzim yang dapat menghidrolisis berbagai jenis glukukan.
2. Menentukan daya inhibisi setiap komponen *kinangan* terhadap semua jenis enzim glukosiltransferase yang terdapat di rongga mulut, guna menentukan efektifitas pemakaian bahan tersebut sebagai anti karies gigi.



5. DAFTAR PUSTAKA

- Baktir, A., Murdiyatmo U.,** 2003. Identifikasi mikroba penghasil dekstranase dari tanah. *J MIPA* **8**: 45-50.
- Baktir, A., Murdiyatmo, U.,** 2005. Produksi, isolasi dan karakterisasi enzim dekstranase dari *Arthrobacter* sp. B7. *Berkala Penelitian Hayati* **10**: 97-101.
- Baktir, A., Murdiyatmo, U., Zaini, N.C., Kuntaman,** 2005. Potensi Enzim Dekstranase dari *Arthrobacter* sp. Galur B7 Sebagai Penghambat Pak Gigi. *Jurnal Hayati* **12**:162-166.
- Baktir, A., Murdiyatmo, U., Kralj, S.,** 2006. Molecular cloning and nucleotide sequencing of dextranase gene from *Arthrobacter* sp B7 and its expression in *E. coli*. Presented at IBC 2004, An Asean Seminar and Workshop, February, 6-10rd, Surabaya.
- Caldwell, R.C., Sandham, H.J., Mann, W.V., et al.,** 1971. The effect of dextraanse mouthwash on dental plaque in young adult and children. In **Balakrishnan, M., Simmonds, R., Tagg, J.R.,** 2000. Dental Caries is Preventable Infectious Disease. *Australian Dental Journal* **45**: 235-245.
- Balakrishnan, M., Simmonds, R., Tagg, J.R.,** 2000. Dental Caries is Preventable Infectious Disease. *Australian Dental Journal* **45**: 235-245.
- Cury ,J.A., Rebelo M.A.B., Del Bel Cury, A.A., Derbyshire, M.T.V.C., Tabchoury CPM,** 2000. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res* **34** : 491-497.
- Ebisu, S., Misaki, A., Kato, K., and Kotani, S.,** 1974. The structure of water insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans*, *Carbohydr. Res.*, **38**: 370-374.
- Horton, WA., Jacob AE, Green RM, Hillier VF, Drucker DB,** 1985. The cariogenicity of sucrose, glucose and maize starch in gnotobiotic rats mono-infected with starins of the bacteria. *c, Streptococcus salivarius,* and *Streptococcus milleri.* *Arch Oral Biol* **30**: 777-780.
- Koo, H., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Park, Y.K., Bowen, W.,** 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity, *AAC* **46**: 1302-1309.

- Lebene, R.R.**, 1971. A clinical study on the effect of dextranase on human dental plaque. In **Balakrishnan, M., Simmonds, R., Tagg, J.R.**, 2000. Dental Caries is Preventable Infectious Disease. *Australian Dental Journal* **45**: 235-245.
- Monchois, V., Willemort, R., Monsan, P.**, 1999. Glucansucrase : Mechanism of action and struktur-function relationships, *FEMS Microbiologi Reviews* **23** :131-151.
- Murdiyatmo, U.**, 1996. Isolasi dan identifikasi parsial bakteri penghasil enzim dekstranase. *Majalah Penelitian Gula* **32**: 1-7.
- Okushima, M., Sugino, D., Kouno, Y., Nakano, S., Miyahara, J., Toda, H., Kubo, S., Matsushiro, A.**, 1991. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the *Arthrobacter* dextranase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Jpn. J. Genet* **66**: 173-187.
- Rosen, S.**, 1991. Dental caries: Essential dental microbiology. Appleton and Lange A Publishing Division of Prentice Hall 341-355.
- Kralj, S.**, 2004. Glucansucrases of lactobacilli: Characterization of genes, enzymes, and products synthesized, Ponsen & Looijen B.V. Press, Wageningen, The Netherlands, p. 107.
- Tanzer, J.M., Freedman, M.L., Fitzgerald, R.J., Larsan, R.H.**, 1974. Diminished virulence of glucan synthesis-defective mutants of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **10** : 197-203. In Slots J, Taubman MA, 1992. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. Mostby Yearbook, Inc. United States of America. 267-274,283-298,377-424.
- Taubman MA**, 1992. Immunological aspects of dental caries. In :. Slots J. Taubman MA, eds. Contemporary oral microbiology and immunobiology. St Louis : Mosby Year Book, 533-541.
- Tsuru, D., Hiraoka, N., Fukumoto, J.**, 1972. Substrat specificity of *Aspergillus carneus* dextranase. *J. Biochem* **71**: 653-660.
- Wright^a, W.G., C. Thelwell^a, B. Svensson^b, R.R.B., Sardjoko, R.**, 1991. Inhibition of Catalytic and Glucan-Binding Activities of a Streptococcal GTF Forming Insoluble Glucans, *Caries Research* **36**:353-359.