

TESIS

**POLA SEROTIPE *STREPTOCOCCUS MUTANS* DAN
STREPTOCOCCUS SOBRINUS PADA
PENDERITA KARIES**



Oleh:

NUR DIANAWATI
NIM. 011714153008

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN DASAR
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

TESIS

**POLA SEROTIPE *STREPTOCOCCUS MUTANS* DAN
STREPTOCOCCUS SOBRINUS PADA
PENDERITA KARIES**

Oleh:

NUR DIANAWATI
NIM. 011714153008

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN DASAR
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

**POLA SEROTIPE *STREPTOCOCCUS MUTANS* DAN
STREPTOCOCCUS SOBRINUS PADA
PENDERITA KARIES**

TESIS

Untuk Memperoleh Gelar Magister

Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar

Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Oleh:

**NUR DIANAWATI
NIM. 011714153008**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN DASAR
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2020**

Lembar pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

TANGGAL 08 Januari 2020


Oleh :

Pembimbing Utama



Prof. Dr. Kuntaman, dr., M.S., SpMK(K)
NIP. 195107071979031003

Pembimbing Kedua



Dr. Rini Devijanti Ridwan, drg., M.kes
NIP. 196412161990022001

Mengetahui,

Koordinator Program Studi

Ilmu Kedokteran Dasar Jenjang Magister

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga



Prof. Dr. Kuntaman, dr., M.S., SpMK(K)
NIP. 195107071979031003

TELAH DIUJI PADA

TANGGAL : 08 JANUARI 2020

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Dr. Eko Budi Koendhori, dr., M. Kes., Sp.MK(K)

Anggota : 1. Prof. Dr. Kuntaman, dr., M.S., SpMK(K)

2. Dr. Rini Devijanti Ridwan, drg., M.Kes.

3. Dr. Ira Widjiastuti, drg., M.Kes., SpKG(K)

4. Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes.

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Nur Dianawati
Nim : 011714153008
Program studi : Ilmu Kedokteran Dasar
Judul tesis : POLA SEROTIPE *STREPTOCOCCUS MUTANS*
DAN *STREPTOCOCCUS SOBRINUS* PADA
PENDERITA KARIES

Dengan ini menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis saya ini adalah asli (hasil karya sendiri) bukan merupakan hasil peniruan (Plagiarism) dari karya orang lain. Tesis ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik.

Dalam tesis ini tidak terdapat pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka. Demikian pernyataan ini dibuat tanpa adanya paksaan dari pihak manapun, apabila pernyataan ini tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi dengan norma dan peraturan yang berlaku di Universitas Airlangga

Surabaya, 20 januari 2020



Nur dianawati
011714153008

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur Kehadirat Allah SWT, atas berkah dan rahmatNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “ **Pola Serotipe *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sobrinus* pada Penderita Karies** “ Terselaikannya penulisan tesis ini merupakan berkah luar biasa dari Allah SWT, dengan peran serta dari berbagai pihak, untuk itu perkenankanlah saya menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE, MT., Ak., CMA selaku Rektor Universitas Airlangga.
2. Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
3. Prof. Dr. Kuntaman, dr., M.S., SpMK(K) selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Universitas Airlangga
4. Artur Pohan Kawilarang dr., M.Kes., Sp.MK (K) selaku Ketua Minat Mikrobiologi Universitas Airlangga
5. Prof. Dr. Kuntaman, dr., M.S., SpMK(K) selaku pembimbing utama dan tim pengajar Mikrobiologi yang telah memberikan ilmunya, membimbing saya, meluangkan waktu dan memberikan support selama ini
6. Dr. Rini Devijanti Ridwan, drg., M.Kes. selaku pembimbing kedua, yang senantiasa meluangkan waktunya, memberikan saran, bimbingan dan support yang luar biasa .
7. Dr. Eko Budi Koendhori, dr., M. Kes., Sp.MK(K) selaku ketua penguji dan Dr. Ira Widjiastuti, drg., M.Kes., SpKG(K), Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes. selaku anggota penguji
8. Seluruh Staf Pengajar Progam Studi Ilmu Kedokteran Dasar dan Seluruh Staf Pengajar Minat Mikrobiologi atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan magister ini.

9. Ninuk Hariyani drg., M.kes., MPH.PhD yang telah meluangkan waktunya memberikan masukan, saran dalam analisa data statistik penelitian ini.
10. Direktur RSGM Prof. Dr. Soengeng Waluyo, drg., M.Kes., Sp.KGA(K), Setyabudi, drg, Mkes., SpKG(K) selaku Ketua KSM Konservasi, Ardianti, drg., Sp.KGA selaku Ketua KSM Ilmu Kedokteran Gigi Anak yang telah memberikan kesempatan untuk melaksanakan penelitian di RSGM FKG UNAIR.
11. Institut Ilmu Kesehatan Bhakti wiyata Kediri selaku sponsor utama yang telah memberikan saya kesempatan untuk melanjutkan studi jenjang Magister.
12. Para kru penelitian RSGM perawat bagian konservasi gigi Bu Simpen, dan perawat bagian Kedokteran Gigi Anak yang selalu membantu memberikan semangat dalam menjalani penelitian ini.
13. Tim Laboratorium GDC pak sugeng dan mas rizal yang selalu membantu memberikan semangat dalam menjalani penelitian ini
14. Mas Eta, Mbak nur dan semua karyawan laboratorium Reseach Center FKG
15. Kedua orang tua saya Bpk Achmad Soewarto dan Ibu Susilowati yang selalu memotivasi memberikan dukungan dan selalu mendo'akan yang terbaik sehingga dapat terselesaikannya tesis ini.
16. Mertua saya (Alm) Bpk Purnomo dan Ibu Mu'awanah yang selalu mendo'akan yang terbaik sehingga dapat terselesaikannya tesis ini.
17. Suamiku tercinta drg. Rudi Irawan yang selalu memberikan ridhonya, motivasi, mendampingi, mendo'akan sehingga tesis ini dapat terselesaikan.
18. Anak-anakku tersayang Arya, Arvin, Arfathan "Trio Ar" sholehnya mama yang telah memberikan semangat, mengikhaskan waktunya, *mood booster* mama disaat mama susah maupun senang.
19. Sahabat- sahabat IKD minat mikrobiologi Ardiah, mbak Reni, Marinda yang selalu memberikan dukungan, berjuang bersama dalam menyelesaikan tesis ini di kala susah maupun senang.

20. Semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu.

Semoga segala bantuan yang bapak/ibu/ saudara berikan menjadi amalan kebaikan, pahala dan menjadi berkah untuk kita semua. Akhir kata semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Aamiin ya Rabbal 'alamin.

Surabaya, 20 Januari 2020

Penulis

RINGKASAN

**POLA SEROTIPE *STREPTOCOCCUS MUTANS* DAN
STREPTOCOCCUS SOBRINUS PADA
PENDERITA KARIES
(Penelitian analitik observasional)**

Nur Dianawati

Prevalensi karies masih sangat tinggi khususnya di Indonesia sebagaimana berdasarkan data Riskesdas Kemenkes RI pada tahun 2018 masih jauh dari yang ditargetkan oleh WHO (Riskesdas, 2018). Karies gigi merupakan salah satu penyakit infeksi yang menyerang hampir milyaran penduduk di seluruh dunia dengan tingkat aktivitas karies dan jumlah lesi yang berbeda pada tiap individu (Esberg *et al.*, 2017). *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sobrinus* dalam biofilm menghasilkan asam organik sebagai produk sampingan dari metabolisme karbohidrat yang dapat difermentasi. Asam ini menyebabkan pH lokal turun di bawah nilai kritis yang menyebabkan demineralisasi jaringan gigi (Selwitz *et al.*, 2007).

S.mutans memiliki dinding polisakarida sebagai antigen permukaan yang memiliki spesifik polisakarida yaitu RGP (*Rhamnose Glucose Polysacarida*), antigen permukaan ini nantinya akan berikatan dengan reseptor permukaan dari gigi yang berupa matriks ekstraseluler protein permukaan. Perbedaan karakteristik ini yang membedakan *S.mutans* ini menjadi beberapa serotipe yaitu serotipe c, e f dan k dan *S.sobrinus* menjadi serotipe d dan g.

Penelitian ini adalah penelitian Analitik observasional yang bertujuan untuk melihat hubungan serotipe *S.mutans* dan *S.sobrinus* pada penderita karies rendah dan karies tinggi, pasien anak-anak dan dewasa di RSGM (Rumah Sakit Gigi dan Mulut) FKG (Fakultas Kedokteran Gigi) Universitas Airlangga Surabaya. Semua pasien yang berpartisipasi dalam ini penelitian mengisi *questioner* dan telah menandatangani *informed consent* sebelum diambil sampelnya. Gigi yang diperiksa adalah gigi molar satu rahang atas maupun rahang bawah. Jenis kariesnya adalah karies superficial atau karies media dengan gigi yang masih vital. Identifikasi bakteri *S.mutans*, *S.sobrinus* dan serotipenya menggunakan multiplex PCR.

Gigi pasien dipilih pada salah satu gigi molar satu yaitu gigi 16,26,36,46 diambil dengan menggunakan ekskavator steril, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi *Brain Heart Infusion Broth* BHI (Merck) dengan cara langsung ke dasar tabung. Selanjutnya dimasukkan kedalam *incubator* selama 24 jam dengan 37 °C. Pada hari kedua diamati pertumbuhan pada media jika terlihat keruh berarti ada pertumbuhan, selanjutnya ditanam pada media selektif *Tryptone Yeast Cystine Sucrose Bacitracin* TYCSB (Himedia) dengan menggunakan ose dengan teknik *streaking* kemudian inkubasi 2 kali 24 jam. Hari ketiga, diamati pertumbuhan koloni pada media agar selektif TYCSB jika terdapat pertumbuhan koloni diamati ciri-ciri makroskopik koloni pada *Streptococcus mutans* yaitu bentuk

kristal mengeras dan lengket pada media agar. Metode *multiplex PCR* digunakan untuk mendeteksi serotipe. Hasil amplifikasi akan divisualisasi dengan metode *elektroforesis*. Untuk mengidentifikasi isolat *S. mutans* serotipe c,e,f dilakukan dengan menggunakan tiga primer spesifik spesies dari gen *rhamnose glukosa polisakarida* (rgp) secara bersamaan. Primer yang digunakan (5'-3') GTF-B F :ACT ACA CTT TGC GGT GGC TTGG GTF-B R :CAG TAT AAG CGC CAG TTT CACT untuk identifikasi *S.mutans*. Serotipe c SC-F: CGG AGT GCT TTT TAC AAG TGC TGG SC-R :AAC CAC GGC CAG CAA ACC CTTT AT, serotipe e SE-F CCT GCT TTT CAA GTA CCT TTC GCC SE-R: CTG CTT GCC AAG CCC TAC TAG AAA, serotipe f SF-F: CCC ACA ATT GGC TTC AAG AGG AGA SF-R: TGC GAA ACC ATA AGC ATA GCG AGG dan *S.sobrinus* serotipe d GTF-I F : GAT AAC TAC CTG ACA GCT GACT GTF-I R : AAG CTG CCT TAA GGT AAT CACT. Prosedur Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode TE. Koloni pada media TYCSB diambil 10- 15 koloni diinokulasi dengan ose steril pada tabung *ependorf* yang beridi 100 µL TE buffer. Tabung kemudian disuspensi menggunakan *vortex mixer*. Suspensi dipanaskan di thermostat (*Ependorf, North Amerika*) suhu 95⁰ C selama 10 menit. Tabung kemudian dididindinkan dalam suhu ruangan. Tabung disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Ekstrak DNA yang diperoleh disimpan pada suhu -20⁰C sebelum diamplifikasi (Kuntaman *et al.*, 2018).

Prosedur amplifikasi PCR untuk serotipe *S. mutans*, DNA yang digunakan sebagai *template* diambil sebanyak 3.5 µL. Campuran untuk reaksi PCR adalah 25 µL yang terdiri dari 12,5 µL PCR mix (Dream Taq Green, Thermo Scientific, USA), 0,5 µL (50pmol) setiap primer 3,5 µL *template* DNA bakteri, dan ditambahkan 8,5 µL air distilata. Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR *thermal cycler* (, Biorad Thermal Cycler) (Alni *et al.*, 2018).

Hasil penelitian ini menggambarkan adanya perbedaan significant pada proporsi *streptococcus mutans* dan *streptococcus sobrinus*, dimana proporsi pada anak-anak lebih tinggi dari dewasa. Proporsi *streptococcus mutans* serotipe c,e dan f, serta *S sobrinus* serotipe d pada anak lebih tinggi secara bermakna dari orang dewasa. Sedangkan Proporsi *streptococcus mutans* serotipe c pada anak dan dewasa sama. Tidak ada beda proporsi *streptococcus mutans* serotipe c, e dan f, serta *S sobrinus* serotipe diantara anak dan dewasa.

Terdapat perbedaan bermakna pada proporsi *streptococcus mutans* berdasarkan keparahan karies, dimana pada karies tinggi menunjukkan proporsi *S.mutans* yg lebih banyak. Sementara pada *S.sobrinus* tidak terdapat perbedaan bermakna. Tidak ada beda bermakna pada jenis serotipe berdasar keparahan karies.

SUMMARY

**SEROTYPE PATTERN OF *STREPTOCOCCUS MUTANS*
AND *STREPTOCOCCUS SOBRINUS*
IN CARIES
(*Observational analytic*)**

Nur Dianawati

The prevalence of caries is still very high, especially in Indonesia as based on the Ministry of Health Riskesdas data of the Republic of Indonesia in 2018 which is far from the WHO target (Riskesdas, 2018). Dental caries is an infectious disease that attacks almost billions of people around the world with different levels of caries activity and the number of lesions in each individual (Esberg et al., 2017). *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in biofilms produce organic acids as a byproduct of fermentable carbohydrate metabolism. This acid causes the local pH to fall below the critical value which causes demineralization of dental tissue (Selwitz et al., 2007).

S. mutans have polysaccharide walls as surface antigens that have specific polysaccharides namely RGP (Rhamnose Glucose Polysaccharida), these surface antigens will later bind to the surface receptors of the teeth in the form of surface protein extracellular matrix. This difference in characteristics distinguishes *S. mutans* into several serotypes namely serotypes c, e f and k and *S. sobrinus* into serotypes d and g.

This research is an observational analytic study that aims to see the relationship of *S. mutans* and *S. sobrinus* serotypes in patients with low caries and high caries, children and adults in RSGM (Dental and Oral Hospital) FKG (Faculty of Dentistry) Airlangga University, Surabaya . All patients participating in this study filled out the questionnaire and had signed informed consent before sampling. The teeth examined were maxillary and mandibular permanent first molars. The type of caries is superficial caries or media caries with vital teeth. Identification of *S. mutans* and their serotypes using PCR.

The patient's teeth were selected in one of the first molar teeth namely teeth 16,26,36,46 taken using a sterile excavator, then put into a tube containing a BHI-B Brain Heart Infusion Broth (Merck) by going directly to the bottom of the tube. Then put into the incubator for 24 hours with 37 0C. On the second day growth was observed on the media if it looked cloudy meaning there was growth, then planted on selective media Tryptone Yeast Cystine Sucrose Bacitracin TYCSB (Himedia) using ose with streaking techniques then incubating 2 times 24 hours. The third day, observed the growth of the colony on the media to be selective TYCSB if there was a growth of the colony observed the macroscopic characteristics of the colony on *S. mutans* namely the hardened and sticky crystal form on the agar media.

The PCR multiplex method is used to detect serotypes. The results of the amplification will be visualized using the electrophoresis method. To

identify *S. mutans* serotypes c, e, f isolates were performed using three species-specific primers from the glucose polysaccharide rhamnose gene (rgp) together. DNA extraction procedure, DNA extraction is done by the TE method. Colonies in the TYCSB media were taken 10-15 years then inoculated with sterile ose in an ependorf tube containing 100 μ L TE buffer. The tube is then suspended using a vortex mixer. The suspension is heated at a thermostat (Ependorf, North America) temperature of 950 C for 10 minutes. The tube is then mounted at room temperature. The tubes were centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes. The extracted DNA was stored at -200C before amplification (Kuntamann et al, 2018).

PCR amplification procedure for the *S. mutans* serotype, DNA used as a template was taken as much as 3.5 μ L. The mixture for the PCR reaction was 25 μ L consisting of 12.5 μ L PCR mix (Dream Taq Green, Thermo Scientific, USA), 0.5 μ L (50pmol) for each primary 3.5 μ L bacterial DNA template, and added 8.5 μ L distilled water. The primers used can be seen in the table below. DNA amplification using a thermal cycler PCR machine (Biorad Thermal Cycler) (Alni et al, 2018). Primary used (5'-3 ') GTF-B F: ACT ACA CTT TGC GGT GGC TTGG GTF-B R: CAG TAT AAG CGC CAG TTT CACT for identification of *S. mutans*. Serotype c SC-F: CGG AGT GCT TTT TAC AAG TGC TGG SC-R: AAC CAC GGC CAG CAA ACC CTTT AT, serotype e SE-F CCT GCT TTT CAA GTA CCT TTC GCC SE-R: CTG CTT GCC AAG CCC TAC TAG AAA, serotype f SF-F: CCC ACA ATT GGC TTC AAG AGG AGA SF-R: TGC GAA ACC ATA AGC ATA GCG AGG and *S.sobrinus* serotype d GTF-I F: GAT AAC TAC CTG ACA GCT GACT GTF-I R: AAG CTG CCT TAA GGT AAT CACT.

The results of this study illustrate that there are significant differences in the proportions of *S. mutans* and *S. sobrinus*, where the proportion in children is higher than adults. The proportion of *S. mutans* serotypes e and f, and *S. sobrinus* serotype d in children is significantly higher than in adults. Whereas the proportion of *S. mutans* serotype c in children and adults is the same. There is no difference in the proportion of *S. mutans* serotypes c, e and f, and *S. sobrinus* serotype d between children and adults.

There is a significant difference in the proportion of *S. mutans* based on the severity of caries, where as in high caries it shows a higher proportion of *S. mutans*. While in *S. sobrinus* there were no significant differences. There was no significant difference in the type of serotype based on caries severity.